

**PENGARUH PENAMBAHAN MINERAL $ZnSO_4$ PADA KULIT
PISANG RAJA SEBAGAI BAHAN BAKU FERMENTASI
TERHADAP PRODUKSI ASAM SITRAT**

SKRIPSI

**Oleh:
Haka Marhendra Putra
135100300111100**



**JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH PENAMBAHAN MINERAL ZnSO_4 PADA KULIT
PISANG RAJA SEBAGAI BAHAN BAKU FERMENTASI
TERHADAP PRODUKSI ASAM SITRAT**

SKRIPSI

Oleh:

**Haka Marhendra Putra
135100300111100**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Teknik**

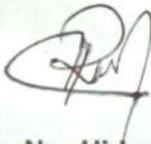


**JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul TA : Pengaruh Penambahan Mineral ZnSO_4
Pada Kulit Pisang Raja Sebagai Bahan
Baku Fermentasi Terhadap Produksi
Asam Sitrat
Nama Mahasiswa : Haka Marhendra Putra
NIM : 135100300111100
Jurusan : Teknologi Industri Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian

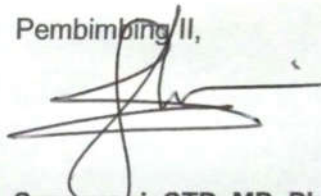
Pembimbing I,



Dr. Ir. Nur Hidayat, MP.

NIP. 19610223 198701 1 001

Pembimbing II,



Suprayogi, STP, MP, PhD.

NIP. 19760825 200312 1 002

Tanggal Persetujuan:

.....

Tanggal Persetujuan:

.....

LEMBAR PENGESAHAN

Judul TA : Pengaruh Penambahan Mineral ZnSO_4
Pada Kulit Pisang Raja Sebagai Bahan
Baku Fermentasi Terhadap Produksi
Asam Sitrat
Nama Mahasiswa : Haka Marhendra Putra
NIM : 135100300111100
Jurusan : Teknologi Industri Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I,



Prof. Dr. Ir. Wignyanto, MS.

NIP. 19521102 198103 1 001

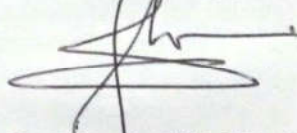
Dosen Penguji II,



Dr. Ir. Nur Hidayat, MP.

NIP. 19610223 198701 1 001

Dosen Penguji III,



Suprayogi, STP, MP, PhD.

NIP. 19760825 200312 1 002

Ketua Jurusan,



Dr. Sucipto, STP, MP.

NIP. 19730602 199903 1 001

Tanggal Lulus TA:

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Blitar, pada tanggal 03 Maret 1994, anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Djainal Abidin dan Tuli'ul Chasanah. Penulis menempuh pendidikan di SDN Krisik 04 (2001-2007), SMPN 1 Wlingi (2007-2010), dan SMAN 1 Talun (2010-2013). Tahun 2013, penulis diterima di Jurusan Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya. Tahun 2018, penulis lulus sebagai Sarjana Teknik.

Selama menempuh pendidikan, penulis aktif dalam mengikuti organisasi maupun ekstrakurikuler. Pada jenjang SMP, penulis mengikuti kegiatan Pramuka dan ekstrakurikuler Karate. Tingkat SMA, penulis juga aktif dalam organisasi Pramuka dan ekstrakurikuler Karate. Pada tingkat perguruan tinggi, penulis aktif dalam LKM *Agritechno Business Centre* (ABC) dan aktif dalam kepanitiaan dan kegiatan yang diselenggarakan oleh LKM ABC, diantaranya adalah menjadi anggota divisi dokumentasi pada kegiatan NAFTEX dan menjadi ketua pelaksana pada kegiatan Sosialisasi Program Mahasiswa Wirausaha.

Alhamdulillah, terimakasih Ya Allah
Karya kecil ini aku persembahkan kepada kedua Orang Tuaku
dan adik-adikku

PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Haka Marhendra Putra
NIM : 135100300111100
Jurusan : Teknologi Industri Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian
Judul TA : Pengaruh Penambahan Mineral ZnSO_4
Pada Kulit Pisang Raja Sebagai Bahan
Baku Fermentasi Terhadap Produksi
Asam Sitrat

Menyatakan bahwa,

TA dengan judul di atas merupakan karya asli penulis tersebut di atas. Apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, saya bersedia dituntut sesuai hukum yang berlaku.

Malang, Februari 2018
Pembuat pernyataan,

Haka Marhendra Putra
NIM. 135100300111100

HAKA MARHENDRA PUTRA. 135100300111100. Pengaruh Penambahan Mineral ZnSO_4 pada Kulit Pisang Raja Sebagai Bahan Baku Fermentasi Terhadap Produksi Asam Sitrat. TA. Pembimbing: Dr. Ir. Nur Hidayat, MP. dan Suprayogi, STP, MP, PhD.

RINGKASAN

Tanaman pisang (*Musaceaea* sp.) merupakan tanaman penghasil buah yang banyak terdapat di Indonesia. Buah pisang banyak dimanfaatkan untuk produk industri pangan, salah satunya adalah produk Kripik Pisang Raja yang diproduksi oleh UKM Fronizka Indomedia Sukses yang terdapat di Kabupaten Malang. Produksi kripik pisang Raja menghasilkan limbah kulit pisang yang berlimpah. Dalam penelitian ini kulit pisang dimanfaatkan sebagai substrat bahan baku produksi asam sitrat dengan metode fermentasi padat oleh *Aspergillus niger*. Produksi asam sitrat dengan metode fermentasi padat memiliki keunggulan teknik yang sederhana dan biaya lebih rendah. Dilaporkan bahwa kandungan seng (Zn) dapat meningkatkan produksi asam sitrat karena Zn berperan menstimulus fisiologis *Aspergillus niger* dan diperlukan untuk perkembangbiakan sel. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui konsentrasi larutan garam mineral ZnSO_4 yang optimal dalam proses produksi asam sitrat.

Penelitian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAK) non faktorial. Faktor perlakuannya yaitu konsentrasi ZnSO_4 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Parameter Uji yang dilakukan meliputi pH, Total Gula Reduksi (TGR), kadar asam sitrat, dan analisa spektroskopi inframerah (FTIR).

Hasil penelitian menunjukkan pemberian ZnSO_4 pada setiap level perlakuan memberikan hasil yang tidak berbeda pada pH hasil fermentasi. Level perlakuan ZnSO_4 memberikan hasil TGR yang fluktuatif pada setiap level perlakuan. Hasil

analisa kadar asam sitrat menunjukkan peningkatan kadar asam sitrat yang signifikan pada setiap level konsentrasi ZnSO_4 . Perlakuan terbaik diperoleh dari konsentrasi ZnSO_4 10 ppm. Kadar asam sitrat yang dihasilkan 26,62%, total gula reduksi yang terkandung sebesar 164,10 mg/g, dan nilai pH 3,22. Hasil analisa spektroskopi inframerah (FTIR) pada sampel perlakuan terbaik teridentifikasi terdapat kandungan asam sitrat. Dibuktikan dengan adanya tiga gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$), didukung dengan adanya gugus O-H, dan terdapat gugus C-O.

Kata Kunci: Asam Sitrat, *Aspergillus niger*, Kulit Pisang Raja, ZnSO_4 .

HAKA MARHENDRA PUTRA. 135100300111100. *Effects of Addition Mineral ZnSO₄ in Raja Banana Peels as A Fermentation Substrat for Production of Citric Acid.* Minor Thesis. Supervisor: Dr. Ir. Nur Hidayat, MP. and Suprayogi, STP, MP, PhD.

SUMMARY

The banana plant (Musaceaea sp.) is a fruit-producing plant widely found in Indonesia. Bananas used for food industry products, one of them is Raja Banana chips, produced by UKM Fronizka Indomedia Sukses, which is located in Malang. Production of Raja banana chips produces a lot of banana peels waste. In this study, banana peels is used as a substrate of citric acid production by solid state fermentation by Aspergillus niger. The production of citric acid by solid state fermentation method has the advantages of simple technique and lower cost. Zn can increase citric acid accumulation because Zn plays a role in determining the physiological state of Aspergillus niger and is necessary for cell proliferation. The purpose of this study was to determine the optimal concentration of ZnSO₄ mineral salt solution in citric acid production process.

The research is used Non Factorial Completely Randomized Design. The treatment factor was ZnSO₄ concentration of 2 ppm; 4 ppm; 6 ppm; 8 ppm and 10 ppm. The tests include pH, Total Sugar Reduction, citric acid content, and infrared spectroscopy analysis (FTIR).

The results showed that ZnSO₄ addition at each treatment level gave no different result on pH. The ZnSO₄ treatment level gives a fluctuating total sugar reduction result at each treatment level. The result of citric acid content analysis showed a significant increase of citric acid level at each level of ZnSO₄ concentration. The best treatment was obtained from ZnSO₄ concentration of 10 ppm. The citric acid content was 26.62%,

the total reducing sugar contained was 164,10 mg/g, and the pH value was 3.22. The results of infrared spectroscopy analysis (FTIR) in the best treatment sample identified the content of citric acid. It is proved by the presence of three carbonyl groups (C = O), supported by the presence of O-H, and there is a C-O group.

Keywords: *Aspergillus niger, Citric Acid, Raja Banana Peels, ZnSO₄.*

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur bagi Allah SWT yang selalu memberikan kemudahan, kelancaran, dan segala ridha-Nya sehingga penulis dapat menyusun laporan Tugas Akhir yang berjudul “Pengaruh Penambahan Mineral ZnSO_4 Pada Kulit Pisang Raja Sebagai Bahan Baku Fermentasi Terhadap Produksi Asam Sitrat”. Waktu dan tenaga telah dicurahkan untuk menyelesaikan laporan ini. Bantuan serta dorongan dari berbagai pihak telah memberikan masukan yang berarti dalam menyelesaikan tugas akhir ini.

Terkait dalam penulisan laporan ini, penulis tidak lupa menyampaikan terimakasih kepada:

1. Dr. Ir. Nur Hidayat, MP. selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, koreksi, masukan, arahan dan motivasi serta pengetahuan mengenai penulisan ilmiah kepada penulis.
2. Suprayogi, STP., MP., PhD selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, koreksi, masukan, saran dan motivasi kepada penulis.
3. Prof. Dr. Ir. Wignyanto, MS. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran serta masukan yang sangat membantu dalam penulisan laporan.
4. Dr. Sucipto, STP., MP. selaku Ketua Jurusan Teknologi Industri Pertanian yang telah mendukung dan mengesahkan tugas akhir.
5. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Teknologi Industri Pertanian yang telah memberikan bekal dan ilmu dalam penyusunan tugas akhir.
6. Yuli Erna selaku Laboran Laboratorium Bioindustri yang telah memberikan masukan dan bantuan selama penelitian.

Demikian yang dapat penulis sampaikan. Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari kata sempurna. Saran dan masukan semoga dapat digunakan demi memperkaya laporan ini. Semoga laporan ini dapat memberikan

banyak manfaat bagi penulis sendiri dan semua pihak yang membutuhkannya.

Malang, Februari 2018
Penyusun,

Haka Marhendra Putra

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	v
RIWAYAT HIDUP	vii
PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR	xi
RINGKASAN	xiii
SUMMARY	xv
KATA PENGANTAR	xvii
DAFTAR ISI.....	xix
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR GAMBAR	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN	xxv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Kulit Buah Pisang Raja	5
2.2 Asam Sitrat	6
2.2.1 Sifat Fisika dan Kimia Asam Sitrat	7
2.3 Fermentasi Asam Sitrat.....	9
2.3.1 Mekanisme Pembentukan Asam Sitrat	11
2.3.2 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Terbentuknya Asam Sitrat.....	13
2.4 Kapang <i>Aspergillus niger</i>	16
2.5 <i>Trace Elements</i>	17
2.6 Penelitian Terdahulu	19
2.7 Hipotesis	20
BAB III METODE PENELITIAN.....	23
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan	23

3.2 Alat dan Bahan	23
3.3 Batasan Masalah	23
3.4 Rancangan Penelitian.....	24
3.5 Pelaksanaan Penelitian	24
3.5.1 Pembuatan Media Fermentasi.....	25
3.5.2 Pembuatan Media Beras	26
3.5.3 Pembuatan Starter <i>Aspergillus niger</i>	27
3.5.4 Proses Fermentasi Kulit Pisang.....	28
3.6 Analisis Data.....	28
3.6.1 pH	28
3.6.2 Kadar Asam Sitrat	29
3.6.3 Analisis Gula Reduksi.....	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1 Kadar Asam Sitrat Hasil Fermentasi	35
4.2 Nilai pH Hasil Fermentasi	36
4.3 Nilai Gula Reduksi Hasil Fermentasi.....	37
4.4 Perlakuan Terbaik.....	38
4.5 Analisa Gugus Fungsi dengan Metode FTIR	39
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
5.1 Kesimpulan.....	43
5.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA.....	45

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Kulit Pisang Raja (% bahan kering).....	6
Tabel 2.2 Sifat Fisika dan Kimia Asam Sitrat.....	9
Tabel 2.3 Kelebihan dan Kelemahan Fermentasi Substrat Padat	10
Tabel 2.4 Kandungan Mineral pada Kulit Pisang.....	18
Tabel 3.1 Kombinasi Rancangan Acak Lengkap.....	24
Tabel 4.1 Pengaruh Konsentrasi ZnSO_4 Terhadap Kadar Asam Sitrat Hasil Fermentasi 7 Hari	35
Tabel 4.2 Pengaruh Konsentrasi ZnSO_4 Terhadap pH Hasil Fermentasi 7 hari	36
Tabel 4.3 Pengaruh Konsentrasi ZnSO_4 Terhadap Nilai TGR Hasil Fermentasi 7 Hari.....	37
Tabel 4.4 Pemilihan Perlakuan Terbaik.....	39
Tabel 4.5 Data Spektrum Inframerah dari Ekstrak Kulit Pisang Raja Hasil Fermentasi.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Kimia Asam Sitrat	8
Gambar 2.2 Reaksi Metabolisme yang Terlibat dalam Produksi Asam Sitrat	12
Gambar 2.3 <i>Aspergillus niger</i>	17
Gambar 3.1 Pembuatan Media Fermentasi	25
Gambar 3.2 Pembuatan Media Beras.....	26
Gambar 3.3 Pembuatan Starter <i>Aspergillus niger</i>	27
Gambar 3.4 Proses Fermentasi Kulit Pisang Raja	28
Gambar 4.1 Spektrum Inframerah Ekstrak Kulit Pisang Raja Hasil Fermentasi oleh <i>Aspergillus niger</i>	40
Gambar 4.2 Spektrum Inframerah Asam Sitrat	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Data pH.....	53
Lampiran 2 Kurva Standar Total Gula Reduksi	55
Lampiran 3 Data Total Gula Reduksi (TGR).....	57
Lampiran 4 Data Kadar Asam Sitrat.....	59
Lampiran 5 Pemilihan Perlakuan Terbaik.....	61
Lampiran 6 Data Perlakuan Terbaik.....	63
Lampiran 7 Data Serapan Spektrum Inframerah Perlakuan Terbaik	67
Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian.....	69

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman pisang (*Musaceaea* sp.) merupakan tanaman penghasil buah yang banyak terdapat di Indonesia. Dalam industri pangan, jenis pisang yang banyak dimanfaatkan adalah jenis Pisang Ambon dan Pisang Raja. Salah satu industri pangan berskala UKM yang memanfaatkan buah pisang sebagai bahan baku utama adalah UKM Fronizka Indomedia Sukses yang terdapat di Kepanjen, Kabupaten Malang. UKM tersebut memproduksi Kripik Pisang Raja. Dalam satu kali produksi kripik pisang, UKM Fronizka Indomedia Sukses menggunakan ± 360 Kg Pisang Raja. Berdasarkan jumlah tersebut, dihasilkan limbah kulit pisang sebanyak ± 144 Kg dan belum termanfaatkan. Guna meningkatkan manfaat dari kulit pisang, salah satunya adalah menjadikan kulit pisang sebagai substrat untuk memproduksi asam sitrat dengan bantuan *Aspergillus niger*. Kulit pisang sendiri telah dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi etanol (Gebregergs, dkk., 2016), selulosa *nanopaper* dan *nanofiber* (Khawas, dkk., 2016; Tibolla, dkk., 2014), bahan baku pengolahan air limbah (Memon, dkk., 2009), produksi biometan (Pisutpaisal, dkk., 2014), dan sebagai bahan dasar untuk ekstraksi pektin (Swamy dan Kasiviswanathan, 2017). Selain kulit pisang, berbagai limbah agroindustri telah diteliti dengan metode fermentasi substrat padat untuk mengetahui potensinya sebagai substrat untuk produksi asam sitrat, seperti ampas singkong (Prado, dkk., 2005), sekam kopi (Ramachandra, dkk., 2013), kentang (Lu, dkk., 1995), molase (Cevrimli, dkk., 2009), biji carob (Roukas, 1998), bonggol jagung (Hang dan Woodams, 1998), ubi jalar (Lu, dkk., 1997), limbah jeruk (Zafiris, dkk., 1994), limbah apel (Dhillon, dkk., 2013).

Asam sitrat merupakan asam organik lemah yang terdapat pada daun dan buah tumbuhan tertentu. Senyawa ini merupakan bahan pengawet alami yang baik dan dapat juga

dipakai untuk mengatur tingkat kemasaman pada berbagai pengolahan makanan dan minuman ringan. Asam sitrat dapat diproduksi dengan menggunakan metode fermentasi dengan bantuan mikroorganisme *Aspergillus niger* (Carolina dkk., 2015). *Aspergillus niger* merupakan jamur yang dapat menghasilkan enzim, seperti α -amilase, β -amilase, dan selulase, sehingga dapat digunakan sebagai biokatalis dalam produksi asam sitrat secara fermentasi (Syamsuriputra, dkk., 2006).

Dalam fermentasi asam sitrat, diperlukan unsur mineral agar kapang *Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan baik sehingga dapat diperoleh hasil yang maksimal. Unsur mineral tersebut seperti magnesium (Mg), besi (Fe), seng (Zn) dan tembaga (Cu). Selain itu nutrisi juga diperlukan dalam media pertumbuhan, diantaranya adalah sukrosa atau glukosa yang berguna untuk pertumbuhan kapang dan aktivitas enzim (Kusmiati dan Ni Wayan, 2010; Moresi dan Parente, 2014).

Sebagai substrat untuk produksi asam sitrat, Kulit Pisang Raja memiliki komposisi nutrient dan mineral untuk mendukung pertumbuhan *Aspergillus niger*, diantaranya protein, glukosa, fruktosa, sukrosa, pati, selulosa, dan terdapat beberapa mineral didalamnya meliputi potasium (K), kalsium (Ca), sodium (Na), besi (Fe), dan mangan (Mg) (Mohapatra dkk., 2010). Dilihat dari komposisi kulit pisang tersebut, pada kulit pisang tidak terdapat kandungan seng (Zn) yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Aspergillus niger* dalam memproduksi asam sitrat. Peran seng (Zn) dalam reaksi metabolisme sel yang terlibat dalam produksi asam sitrat adalah mendukung kinerja enzim fosfofruktokinase dalam merombak fruktose-6-P menjadi fruktose-1,6-bisP (Papagianni, 2007). Wold dan Suzuki (1976a) melaporkan bahwa konsentrasi Zn menentukan jalannya fermentasi asam sitrat. Pada tingkat konsentrasi Zn yang tinggi, kultur jamur dipertahankan dalam fase pertumbuhan dan tidak terjadi akumulasi asam sitrat, sedangkan pada tingkat konsentrasi Zn rendah, pertumbuhan kultur jamur menjadi terbatas dan *Aspergillus niger* masuk kedalam tahap produksi asam sitrat. Batasan konsentrasi Zn pada substrat untuk menghasilkan asam sitrat optimal adalah 0,2 ppm sampai 10 ppm (Tran, dkk., 1998). Shankaranand dan Lonsane (1992) mengemukakan

bahwa penambahan Zn^{2+} 0,1 mg/kg dedak gandum meningkatkan produksi asam sitrat sebesar 1,44 kali ketika dibandingkan dengan medium tanpa ditambahkan Zn^{2+} dengan lama waktu fermentasi 24 – 48 jam.

Berdasarkan penjelasan tersebut, Kulit Pisang Raja yang berasal dari limbah UKM Fronizka Indomedia Sukses berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai substrat untuk memproduksi asam sitrat dengan bantuan *Aspergillus niger*. Pada penelitian ini akan dilakukan pengamatan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi larutan garam mineral ZnSO_4 sebagai sumber Zn terhadap produksi asam sitrat dengan substrat Kulit Pisang Raja.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah berapakah konsentrasi larutan garam mineral ZnSO_4 yang optimal dalam proses produksi asam sitrat?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui konsentrasi larutan garam mineral ZnSO_4 yang optimal dalam proses produksi asam sitrat.

1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Membantu mengurangi dan meningkatkan nilai tambah terhadap limbah Kulit Pisang Raja sebagai sumber penghasil asam sitrat.
2. Mengetahui konsentrasi ZnSO_4 yang optimal sebagai sumber seng (Zn) untuk mendukung metabolisme sel dan menaikkan produksi asam sitrat dari limbah Kulit Pisang Raja.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit Buah Pisang Raja

Pisang (*Musaceaea sp.*) merupakan salah satu buah tropis yang paling populer dikonsumsi di seluruh dunia (Nathoa, dkk., 2014). Pisang merupakan tanaman herba dari keluarga *Musaceae*. Pisang berasal dari daerah tropis di Asia Selatan, yang saat ini sudah banyak dibudidayakan di seluruh daerah tropis. Tanaman pisang merupakan tanaman penghasil buah yang banyak terdapat di Indonesia, buahnya sangat disukai untuk dikonsumsi secara langsung sebagai buah atau diolah menjadi produk konsumsi lain. Selain itu tanaman pisang juga dimanfaatkan untuk produksi serat, dan pada jenis tertentu untuk tanaman hias (Anhwange, 2008; Tritanti dan Ika, 2015).

Pemanfaatan buah pisang yang besar untuk berbagai jenis makanan akan menghasilkan limbah berupa kulit pisang. Salah satu industri pangan berskala UKM yang memanfaatkan buah pisang sebagai bahan baku utama adalah UKM Fronizka Indomedia Sukses yang terdapat di Kepanjen, Kabupaten Malang. UKM tersebut memproduksi Kripik Pisang Raja. Dalam satu kali produksi kripik pisang, UKM Fronizka Indomedia Sukses menggunakan ± 360 Kg Pisang Raja. Berdasarkan jumlah tersebut, dihasilkan limbah kulit pisang sebanyak ± 144 Kg dan belum termanfaatkan. Bobot kulit pisang mencapai 40% dari buahnya (Hanum, dkk., 2012). Kulit dari buah pisang merupakan salah satu limbah agro yang dibiarkan tanpa mekanisme pembuangan. Kulit pisang merupakan salah satu contoh dari limbah pertanian yang tersedia secara alami. Umumnya buah pisang dikonsumsi dan sebagian besar kulit dibuang sebagai limbah padat. Potensi aplikasi kulit pisang tergantung pada komposisi kimianya, hal ini terutama terdiri dari biopolimer alam di dinding sel tanaman seperti selulosa, hemiselulosa, pektin, lignin dan protein yang dapat digunakan dalam sintesis nanopartikel (Gopi, dkk., 2014). Komposisi kulit

pisang Raja berdasarkan bahan kering dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1. Komposisi kulit pisang Raja (% bahan kering)

Parameter	Persentase
Bahan kering	14,3
Protein kasar	8,1
Lemak kasar	12,1
Serat kasar	8,2
Kadar air	78,9

Sumber: Karthikeyan dan Nallusamy, 2010

Selain komposisi tersebut, pada kulit pisang juga terdapat kandungan karbohidrat sebesar 540,1 mg/g dengan tingkat kemasakan setengah matang yang ditandai dengan warna kulit hijau kekuningan (Mosa dan Ayman, 2015; Lii, dkk., 1982), dan nutrisi dasar lainnya yang dapat mendukung pertumbuhan mikroba. Kulit pisang telah dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi etanol (Gebregergs, dkk., 2016), selulosa *nanopaper* dan *nanofiber* (Khawas, dkk., 2016; Tibolla, dkk., 2014), bahan baku pengolahan air limbah (Memon, dkk., 2009), produksi biometan (Pisutpaisal, dkk., 2014), dan sebagai bahan dasar untuk ekstraksi pektin (Swamy dan Kasiviswanathan, 2017). Berdasarkan kandungan nutrisi yang tinggi pada kulit pisang, berpotensi dapat dimanfaatkan sebagai substrat untuk produksi asam sitrat menggunakan *Aspergillus niger* (Karthikeyan dan Nallusamy, 2010).

2.2 Asam Sitrat

Asam sitrat (*2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid*) merupakan komponen alami dan metabolit yang secara umum terdapat dalam tanaman dan hewan. Asam sitrat adalah asam organik yang paling fleksibel dan banyak digunakan dalam makanan dan minuman. Asam sitrat berfungsi untuk khelasi, buffering, penyesuaian pH, dan derivatisasi (Kirk dan Othmer, 2008). Beberapa buah yang memiliki rasa asam yang digunakan dalam minuman, makanan, farmasi, tekstil, logam, kimia dan

industri lainnya, terdapat asam sitrat yang memainkan peran yang sangat penting. Di seluruh dunia, asam sitrat diproduksi secara komersial dalam jumlah jutaan ton dengan peningkatan tahunan stabil dalam hal konsumsi dan produksi. Dari sudut pandang biokimia, asam sitrat sangat penting mengingat bahwa serangkaian reaksi enzimatik (siklus Krebs atau siklus *tricarboxylic*) pada manusia dan hewan menghasilkan asam sitrat untuk diubah menjadi energi melalui oksidasi lemak, protein dan karbohidrat (Apelblat, 2014).

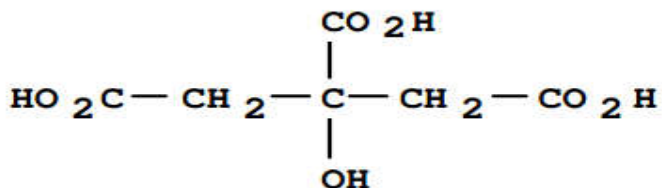
Asam sitrat merupakan produk fermentasi sintesis terbesar kedua di dunia setelah industri fermentasi etanol. Asam sitrat mendominasi kategori asam organik dengan estimasi bioproduksi lebih dari 1,7 juta ton per tahun dan volume bioproduksi asam sitrat terus meningkat hingga pada tingkat tahunan tertinggi sebesar 5% dan menunjukkan tren yang terus meningkat. Hampir 70% dari total produksi asam sitrat digunakan pada industri makanan (Dhillon, dkk., 2013; Liu, dkk., 2015). Asam sitrat dapat diperoleh melalui sintesis kimia, namun biaya yang digunakan jauh lebih tinggi daripada menggunakan fermentasi. Oleh karena itu, produksi asam sitrat dapat menggunakan metode *Solid State Fermentation* (SSF) dengan memanfaatkan kapang *Aspergillus niger* sebagai alternatif dengan biaya lebih murah (Couto dan Angeles, 2006).

2.2.1 Sifat Fisika dan Kimia Asam Sitrat

Asam sitrat, dalam bentuk anhidrat, mengkristal dari larutan air panas seperti kristal bening tidak berwarna atau berbentuk bubuk kristal putih. Kristal asam sitrat berbentuk holohedra monoklinik. Asam sitrat meleleh di udara lembab dan secara optik tidak aktif. Asam sitrat monohidrat memiliki berat molekul 210,14 dan mengkristal dari larutan dingin. Ketika dipanaskan secara perlahan, kristal ter-dehidrasi pada suhu 70°C-75°C dan meleleh pada kisaran suhu 135°C-152°C. Pemanasan secara cepat menyebabkan dehidrasi pada suhu 100°C untuk membentuk kristal dan mencair pada suhu 153°C. Asam sitrat monohidrat tidak tersedia dalam jumlah komersial karena

sebagian besar aplikasi asam sitrat menggunakan bentuk anhidrat (Kirk dan Othmer, 2008).

Asam sitrat (*2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid*) memiliki rumus kimia $C_6H_8O_7$ dan berat molekul 192,12 g/mol (Apelblat, 2014). Berikut ini adalah struktur kimia asam sitrat, dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Struktur kimia asam sitrat (Max, dkk, 2010)

Asam sitrat memiliki tiga gugus karboksil dan satu gugus hidroksil, dengan demikian memiliki tiga kemungkinan konstanta disosiasi asam, tiga nilai K_a dan pK_a . Konstanta disosiasi pertama asam sitrat mirip dengan asam tartarat, konstanta disosiasi kedua setengah dari asam tartarat tetapi tiga kali lebih besar dari asam malat. Mengingat bahwa nilai pH yang seharusnya bernilai antara 2,8 dan 3,8, dapat diasumsikan bahwa disosiasi ketiga tidak terjadi. Oleh karena itu, untuk semua tujuan penggunaan, asam sitrat bertindak sebagai asam diprotik, dengan tingkat keasaman diantara asam tartarat dan asam malat (Moreno dan Rafael, 2012). Sifat fisika dan kimia asam sitrat dapat dilihat pada **Tabel 2.2**.

Tabel 2.2. Sifat fisika dan kimia asam sitrat

Asam Sitrat	
Berat molekul	192,13
Titik lebur (°C)	156
Massa jenis (g/cm ³ , 20°C)	1,665
Kelarutan (g/100 mL air, 20°C)	56,7
pK _{a1} dan K _{a1}	3,08; 8,4 x 10 ⁻⁴
pK _{a2} dan K _{a2}	4,74; 1,8 x 10 ⁻⁵
pK _{a3} dan K _{a3}	5,4; 4 x 10 ⁻⁶

Sumber: Moreno dan Rafael, 2012

2.3 Fermentasi Asam Sitrat

Sintesis produksi asam sitrat dengan fermentasi merupakan cara yang paling ekonomis dan banyak digunakan untuk memproduksi asam sitrat. Produksi asam sitrat dengan fermentasi dapat dibagi menjadi tiga tahap yang meliputi persiapan dan inokulasi bahan baku, fermentasi, dan pengambilan produk asam sitrat. Terdapat tiga metode fermentasi yang dapat digunakan untuk produksi asam sitrat, yaitu dengan cara fermentasi terendam, fermentasi permukaan, dan fermentasi substrat padat (Soccol, dkk., 2006). Dari ketiga cara tersebut, fermentasi substrat padat merupakan metode yang baik untuk memanfaatkan limbah organik padat yang kaya akan nutrisi sebagai substrat.

Fermentasi substrat padat merupakan proses fermentasi dimana mikroorganisme tumbuh pada substrat padat tanpa kehadiran cairan bebas atau dalam konsentrasi air yang sedikit. Substrat padat bertindak sebagai sumber karbon, nitrogen, mineral dan faktor pertumbuhan lainnya yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme yang tumbuh pada substrat padat tumbuh di bawah kondisi yang mirip dengan habitat alami mereka, sehingga dapat menghasilkan enzim dan metabolit tertentu, protein dan spora secara lebih efisien. Substrat padat tidak hanya menyediakan nutrisi bagi kultur mikroorganisme, namun juga dapat digunakan sebagai tempat pertumbuhan sel mikroorganisme (Tanyildizi, dkk., 2007). Fermentasi substrat padat sangat cocok untuk pertumbuhan kapang karena memiliki syarat kelembaban yang rendah. Organisme yang paling umum

digunakan dalam fermentasi substrat padat adalah *Aspergillus niger*, terutama dalam produksi asam sitrat (Chutmanop, dkk., 2008; Soccol, dkk., 2006). Kelebihan dan kelemahan dari fermentasi substrat padat dapat dilihat pada **Tabel 2.3** (Couto dan M. Angeles, 2006):

Tabel 2.3. Kelebihan dan kelemahan fermentasi substrat padat

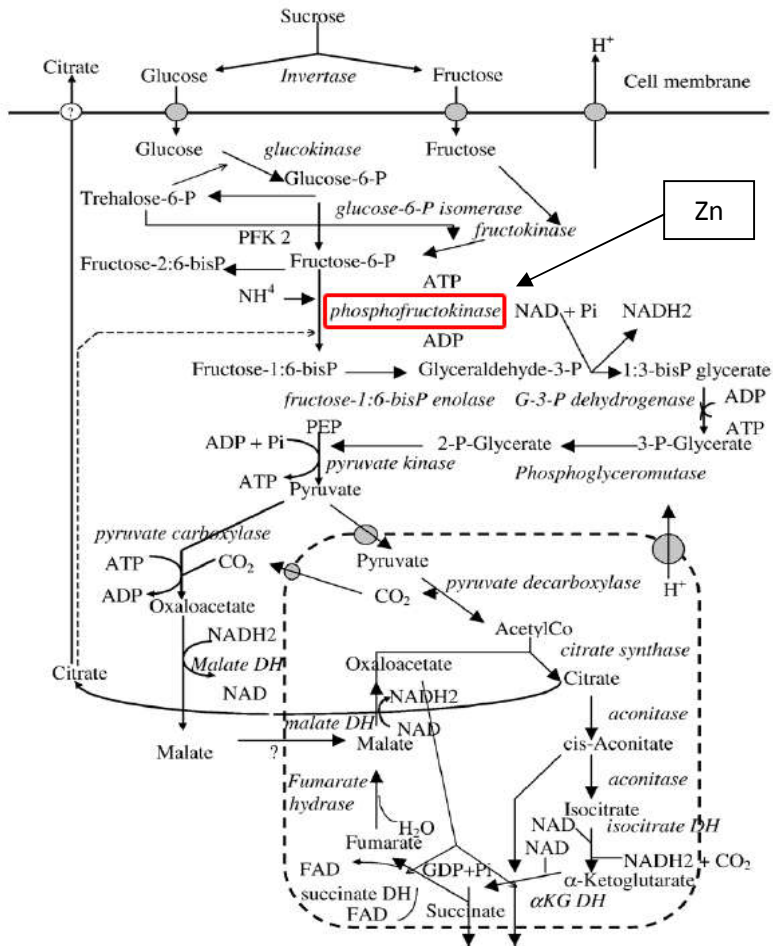
Kelebihan	Kelemahan
Produktifitas tinggi	Sulit diterapkan pada skala lebih besar
Sirkulasi oksigen lebih baik	Sulit memantau parameter pH, kadar air, oksigen, kondisi nutrisi.
Biaya lebih murah	Penghilangan panas metabolit sulit dilakukan
Mengurangi energi dan kebutuhan biaya	Produk pengotor lebih tinggi, sehingga meningkatkan biaya pemulihan produk
Teknologi sederhana	
Substrat menyerupai habitat alami bagi beberapa mikroorganisme	

Sumber: Couto dan Angeles, 2006

Limbah agroindustri merupakan bahan baku yang sering digunakan sebagai substrat fermentasi asam sitrat. Berbagai limbah agroindustri telah diteliti dengan menggunakan metode fermentasi substrat padat untuk mengetahui potensinya dalam memproduksi asam sitrat, seperti ampas singkong (Prado, dkk., 2005), sekam kopi (Ramachandra, dkk., 2013), kentang (Lu, dkk., 1995), molase (Cevrimli, dkk., 2009), biji carob (Roukas, 1998), bonggol jagung (Hang dan Woodams, 1998), ubi jalar (Lu, dkk., 1997), limbah jeruk (Zafirris, dkk., 1994), limbah apel (Dhillon, dkk., 2013). Selain beberapa limbah tersebut, kulit pisang juga merupakan limbah yang potensial untuk dijadikan sebagai substrat dalam memproduksi asam sitrat. Seperti dalam penelitian yang dilakukan oleh Karthikeyan dan Nallusamy (2010) melaporkan bahwa fermentasi asam sitrat dengan menggunakan substrat kulit pisang dapat menghasilkan asam sitrat sebesar 170-180 g/kg d.wt.

2.3.1 Mekanisme Pembentukan Asam Sitrat

Pada umumnya fermentasi asam sitrat melibatkan pati sebagai sumber karbohidrat. Pati dihidrolisis menjadi gula oleh amilase yang diproduksi oleh *Aspergillus niger* atau ditambahkan ke dalam *broth* fermentasi. Fermentasi berlangsung dalam dua fase, yaitu fase pertumbuhan ketika sel berkembang biak, tapi tidak mengakumulasi asam sitrat, diikuti fase diam saat menghasilkan asam sitrat tapi tidak berkembang biak, atau berkembang biak dengan laju yang lebih rendah. Katabolisme aerobik dari sumber karbon seperti glukosa atau fruktosa dalam produksi asam sitrat terdiri dari dua tahap yaitu tahap glikolisis yang mengkonversi glukosa menjadi asam piruvat dan tahap konversi piruvat menjadi asam sitrat melalui siklus Krebs (Syamsuriputra, dkk., 2006; Wold dan Suzuki, 1976b). Reaksi metabolisme yang terlibat dalam produksi asam sitrat dapat dilihat pada **Gambar 2.2**.



Gambar 2.2 Reaksi metabolisme yang terlibat dalam produksi asam sitrat (Papagianni, 2007)

Pada tahap glikolisis, terdapat enzim fosfofruktokinase yang merupakan enzim penting dalam mengkonversi fruktosa-6-P menjadi fruktosa-1:6-bisP. kinerja enzim tersebut dihambat oleh adanya konsentrasi ATP yang tinggi, mangan, dan sitrat. Guna mendukung kinerja enzim fosfofruktokinase, dibutuhkan peran

seng (Zn), sehingga mempercepat konversi glukosa dan fruktosa menjadi piruvat (Papagianni, 2007; Habison, dkk., 1983). Piruvat yang terbentuk dari tahap glikolisis kemudian masuk ke dalam mitokondria, yang merupakan tempat respirasi sel dan berlangsungnya siklus Krebs. Piruvat dikonversi menjadi *acetyl CoA* oleh enzim *pyruvate decarboxylase*. *Acetyl CoA* merupakan titik awal berlangsungnya siklus Krebs, dimana *acetyl CoA* dikonversi menjadi sitrat oleh enzim *citrate synthase*. Akumulasi asam sitrat terjadi karena adanya *fluoroacetate* yang berperan sebagai penghambat siklus Krebs. *Fluoroacetate* berkondensasi dengan *acetyl CoA* membentuk *fluoroacetyl CoA*. Kemudian *fluoroacetyl CoA* berkondensasi dengan *oxaloacetate* untuk membentuk *fluorocitrate* yang menghambat enzim *aconitase* dan mengakibatkan terjadi akumulasi asam sitrat (Papagianni, 2007; Akram, 2014).

2.3.2 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Terbentuknya Asam Sitrat

Proses produksi asam sitrat harus selalu dikontrol. Hal tersebut dilakukan untuk mencegah terbentuknya produk samping yang tidak diinginkan seperti asam oksaloasetat atau asam glukonat. Adapun faktor-faktor yang perlu diperhatikan dalam produksi asam sitrat adalah:

1. Kelembaban dan aktivitas air

Ketersediaan air pada substrat menjadi penting. Dalam fermentasi substrat padat, kelembaban substrat yang rendah dapat menghambat pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme yang tidak diinginkan dibandingkan menggunakan metode fermentasi media cair. Aktivitas air merupakan parameter penting dalam mengukur karakteristik dan potensi air. Aktivitas air dalam substrat yang tinggi akan mempengaruhi aktivitas mikroba. Selain itu, aktivitas air juga dapat menentukan jenis mikroorganisme yang mampu tumbuh pada fermentasi media padat. Kontrol dari parameter ini dapat digunakan untuk memodifikasi produksi metabolisme mikroba (Bhargav, dkk., 2008).

2. Suhu dan transfer panas

Pertumbuhan kapang dan produksi metabolit sekunder dalam fermentasi media padat sangat dipengaruhi oleh suhu dan proses transfer panas pada substrat. Selama fermentasi panas yang dihasilkan dalam jumlah besar sebanding dengan aktivitas metabolit mikroorganisme. Namun kapang mampu tumbuh pada suhu 20°C sampai 50°C. Sehingga suhu optimum untuk pertumbuhan kapang berbeda tergantung untuk produksi produk yang diinginkan (Bhargav, dkk., 2008).

3. Biomassa dan laju pertumbuhan

Biomassa merupakan parameter dasar dalam penentuan karakteristik dan menentukan laju pertumbuhan mikroorganisme dalam proses fermentasi media padat. Penentuan biomassa dalam fermentasi media padat dapat dilakukan secara biokimia, seperti mengubah glukosamin, ergosterol, dan total gula. Komponen tersebut merupakan indikator pertumbuhan optimum biomassa dan tergantung pada substrat fermentasi yang digunakan (Bhargav, dkk., 2008).

4. Transfer massa

Selama fermentasi media padat, hifa kapang membentuk kumpulan spora pada permukaan substrat dengan menghasilkan metabolit sekunder dan enzim. Transfer massa yang terjadi pada fermentasi media padat melibatkan dua komponen mikro dan makro. Transfer massa skala mikro bergantung pada pertumbuhan mikroorganisme yang mana dipengaruhi oleh oksigen dan difusi karbon, penyerapan nutrisi, serta pembentukan metabolit. Sedangkan transfer massa skala makro melibatkan adanya pertukaran udara masuk dan keluar pada proses fermentasi media padat, jenis substrat, pencampuran substrat, desain bioreaktor, ruang antar partikel, variasi ukuran partikel, dan mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi media padat (Bhargav, dkk., 2008).

5. Sumber karbon

Sumber karbon untuk fermentasi sitrat telah menjadi subjek dari banyak penelitian, terutama mengenai penggunaan polisakarida. Secara umum, hanya gula yang cepat diasimilasi oleh mikroorganisme sehingga mempengaruhi hasil asam sitrat yang tinggi. Konsentrasi sumber karbon penting untuk fermentasi asam sitrat. Hasil akhir dari peningkatan asam sitrat dengan konsentrasi gula awal dalam proses *batch*. Produktivitas tertinggi dicapai dengan konsentrasi gula sebesar 14-22%, karena konsentrasi tinggi sumber karbon menekan produksi enzim ketoglutarate dehidrogenase (Max, dkk., 2010).

6. pH media kultur

pH medium penting dalam dua tahapan proses. Pada tahapan proses fermentasi mulai dari spora hingga perkecambahan membutuhkan pH >5. Penyerapan amonia seiring pertumbuhan spora menyebabkan pelepasan proton, sehingga menurunkan pH dan meningkatkan produksi asam sitrat. Nilai pH rendah selama tahap produksi ($\text{pH} \leq 2$) mengurangi risiko kontaminasi oleh mikroorganisme lain dan menghambat produksi asam organik yang tidak diinginkan (glukonat dan asam oksalat) (Max, dkk., 2010).

7. Aerasi

Aerasi berpengaruh pada proses fermentasi. Jika tingkat aerasi terlalu tinggi, tekanan parsial CO_2 terlarut dalam media terlalu rendah. Karbondioksida penting dalam substrat untuk piruvat karboksilase yang mengisi ulang pasokan oksaloasetat untuk sintase sitrat. CO_2 yang cukup dihasilkan dari reaksi dikatalis oleh dekarboksilase piruvat, tetapi aerasi yang berlebihan menyebabkan beberapa kerugian. Sebaliknya, tingkat CO_2 yang tinggi dalam gas dapat merugikan untuk konsentrasi akhir dari asam sitrat dan biomassa yang dihasilkan. Berkurangnya tekanan O_2 dalam jangka pendek menyebabkan perubahan ireversibel dalam produktivitas asam sitrat (Max, dkk., 2010).

8. Waktu Fermentasi

Lama fermentasi memberikan efek yang signifikan terhadap produksi asam sitrat. Produksi maksimal dari asam sitrat

dicapai setelah waktu fermentasi selama 7 hari. Namun setelah 7 hari fermentasi, terdapat penurunan secara signifikan terhadap produksi asam sitrat. Hal ini dipengaruhi karena menurunnya ketersediaan nitrogen dalam media fermentasi, usia jamur, dan berkurangnya kandungan gula pada media fermentasi. Biomassa berat kering meningkat seiring dengan meningkatnya periode fermentasi sampai mencapai tingkat maksimal setelah hari ke 8 (Cevrimli, dkk., 2009).

9. *Trace Elements*

Ion mineral memiliki dampak yang signifikan terhadap akumulasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger*. Ion logam mineral seperti seng, mangan, besi, tembaga, dan magnesium telah diketahui mempengaruhi produksi asam sitrat. Produksi tinggi asam sitrat tercapai jika ketersediaan elemen mineral terpenuhi (Soccol, dkk., 2006).

2.4 Kapang *Aspergillus niger*

Aspergillus niger merupakan jamur berfilamen yang terdapat banyak di lingkungan dan jenis kapang yang paling dikenal karena perannya sebagai produsen asam sitrat. *Aspergillus niger* dalam produksi asam sitrat berfungsi sebagai pendegradasi dalam proses fermentasi. *Aspergillus niger* merupakan organisme yang hidup dalam tanah dengan beragam hidrolitik dan oksidatif enzim yang terlibat dalam pemecahan lignoselulosa tanaman. Berbagai enzim dalam *Aspergillus niger* berperan penting dalam industri bioteknologi. *Aspergillus niger* merupakan organisme penting untuk beberapa bidang penelitian seperti sekresi protein eukariotik, mekanisme molekuler penting untuk pengembangan proses fermentasi, dan mekanisme yang terlibat dalam kontrol morfologi jamur (Baker, 2006).



Gambar 2.3 *Aspergillus niger* (Ghautam dan Bhadauria, 2012)

Aspergillus niger pertama kali ditemukan untuk memproduksi asam sitrat dalam jumlah besar dalam media yang mengandung gula tinggi oleh Currie pada tahun 1917. Selain itu, *Aspergillus niger* memiliki toleransi yang tinggi terhadap kondisi bertekanan tinggi termasuk pada media dengan pH rendah (2–3,5). Tentunya kemampuan ini sangat baik untuk dimanfaatkan dalam produksi asam sitrat dengan substrat organik dengan harga murah. Selain asam sitrat, *Aspergillus niger* mampu menghasilkan asam glukonat dan asam oksalat dalam jumlah tinggi (Yang, dkk., 2016). Keuntungan utama menggunakan *Aspergillus niger* dalam produksi asam sitrat adalah kemudahan penanganan, kemampuannya untuk memfermentasi berbagai bahan baku organik, dan hasil *yield* yang tinggi. (Soccol, dkk., 2006; Najafpour, 2015).

2.5 Trace Elements

Dalam fermentasi asam sitrat, sejumlah mineral logam (*trace elements*) dibutuhkan untuk mendukung pertumbuhan *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* dapat memanfaatkan mineral tertentu sebagai nutrisi selama biosintesis asam sitrat.

Kehadiran magnesium (Mg), mangan (Mn), besi (Fe), tembaga (Cu) dan seng (Zn) merupakan mineral logam yang penting bagi pertumbuhan *Aspergillus niger*. Mineral logam diharapkan dapat melakukan perubahan mutasi pada *Aspergillus niger* dan juga berperan dalam mempengaruhi metabolisme sel yang terlibat dalam fermentasi. Mekanisme-nya adalah mikro elemen berperan dalam memberi nutrisi *Aspergillus niger* yang membentuk bagian dari beberapa sistem enzimatik (Angumeenal dan Venkappaya, 2013; Papagianni, 2007).

Pada kulit pisang terdapat beberapa kandungan mineral yang berpotensi dalam mendukung pertumbuhan *Aspergillus niger* selama proses fermentasi untuk menghasilkan asam sitrat. Kandungan mineral tersebut diantaranya adalah Kalsium (Ca), sodium (Na), fosfat (P), potasium (K), besi (Fe), magnesium (Mg), dan sulfur (S). Komposisi kandungan mineral pada kulit pisang dapat dilihat pada **Tabel 2.4**.

Tabel 2.4. Kandungan Mineral pada Kulit Pisang

Mineral	Kandungan (mg/100g)
Ca	7
Na	34
P	40
K	44
Fe	0,93
Mg	26
S	12

Sumber: Essien, dkk, 2005

Tabel 2.4 menunjukkan pada kulit pisang tidak terdapat mineral seng (Zn) yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Aspergillus niger* dalam memproduksi asam sitrat. Oleh karena itu perlu dilakukan penambahan mineral Zn pada substrat kulit pisang untuk menghasilkan asam sitrat yang optimal.

Aspergillus niger biasanya menghasilkan banyak metabolit primer yang berguna seperti sitrat dan asam oksalat sebagai produk yang dominan. Batasan fosfat dan logam tertentu seperti seng (Zn), tembaga (Cu), besi (Fe), dan mangan (Mn)

dibutuhkan untuk menghasilkan asam sitrat yang dominan. Konsentrasi rendah seng (Zn) dalam medium fermentasi umumnya dibutuhkan di sebagian besar media untuk produksi asam sitrat. Dilaporkan bahwa kandungan seng (Zn) dapat meningkatkan asam sitrat. Seng (Zn) berperan dalam menentukan keadaan fisiologis *Aspergillus niger* dan diperlukan untuk perkembangbiakan sel. Peran seng (Zn) dalam reaksi metabolisme dalam produksi asam sitrat adalah mendukung kinerja enzim fosfofruktokinase dalam merombak fruktose-6-P menjadi fruktose-1,6-bisP (Papagianni, 2007). Konsentrasi seng yang tinggi berpengaruh pada fase pertumbuhan *Aspergillus niger* dan konsentrasi seng yang rendah berpengaruh pada fase diam (stasioner). Pada kadar seng yang tinggi, sel-sel terkendali dalam fase pertumbuhan, sementara pada kadar seng yang rendah pertumbuhan menjadi terhambat dan sel-sel masuk ke dalam tahap asidogenik. Dengan kata lain, bila kadar seng rendah pertumbuhan *Aspergillus niger* terhambat dan menghasilkan asam sitrat yang lebih tinggi, sedangkan ketika kadar seng meningkat, laju pertumbuhan *Aspergillus niger* juga meningkat dan terjadi penurunan asam sitrat secara bersamaan. Oleh karena itu perlu adanya batasan konsentrasi seng (Zn) yang tepat pada substrat, yaitu sebesar 0,2 ppm sampai 10 ppm untuk menghasilkan asam sitrat yang optimal (Wold dan Suzuki, 1976a; Tran, dkk., 1998).

2.6 Penelitian Terdahulu

Menurut Shankaranand dan Lonsane (1992) larutan garam mineral ZnSO_4 digunakan sebagai sumber seng (Zn) pada produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* dengan substrat dedak gandum. Penambahan seng (Zn) 0,1 mg/kg dedak gandum meningkatkan produksi asam sitrat sebesar 1,44 kali ketika dibandingkan dengan medium tanpa ditambahkan seng (Zn) dengan lama waktu fermentasi 24 – 48 jam. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa penambahan seng (Zn) sebesar 100 mg/kg dedak gandum menghasilkan asam sitrat paling sedikit (2,26 g/kg dedak gandum) dibandingkan dengan penambahan seng (Zn) sebesar 0,1 mg/kg dedak gandum yang menghasilkan

asam sitrat terbesar (18,29 g/kg dedak gandum) dalam waktu fermentasi 24 jam, maka dapat disimpulkan bahwa penambahan mineral seng (Zn) dengan jumlah yang tepat dapat memacu produksi asam sitrat, namun jika penambahan berlebih dapat menghambat produksi asam sitrat karena bersifat toksik.

Guilherme dkk. (2007) mengungkapkan bahwa, penambahan ZnSO_4 sebesar 6,5 ppm memberikan kondisi yang optimal dalam produktivitas asam sitrat oleh *Aspergillus niger* dengan media tongkol jagung. Dari penelitian tersebut dijelaskan bahwa dengan penambahan Zn^{2+} sebesar 6,5 ppm, diperoleh hasil asam sitrat tertinggi sebesar $33,35 \text{ g L}^{-1}$, sedangkan untuk produktivitas asam sitrat maksimal diperoleh pada 10 hari fermentasi dengan nilai $2,95 \text{ g L}^{-1} \text{ hari}^{-1}$.

Menurut penelitian Abbas, dkk (2016), produksi asam sitrat dengan metode fermentasi dengan substrat kulit pisang (*Musa acuminata*) menggunakan *Asperillus niger*, diketahui bahwa waktu inkubasi 8 hari telah menghasilkan produksi asam sitrat yang maksimal ($51,68 \text{ g L}^{-1}$) dengan bantuan kapang *Aspergillus niger* menggunakan kulit pisang sebagai substrat.

2.7 Hipotesis

Diduga penambahan mineral ZnSO_4 dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm dapat meningkatkan kadar asam sitrat hasil fermentasi dengan bantuan *Aspergillus niger* yang menggunakan substrat kulit Pisang Raja.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioindustri Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan bulan Oktober tahun 2017.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan untuk penelitian meliputi timbangan analitik, gelas ukur, gelas beaker, *hot plate*, pipet, pengaduk, tabung reaksi, kapas, kertas cokelat, plastik penutup, autoklaf, erlenmeyer 250 ml, oven, jarum ose, cawan petri, kertas saring, termometer, pH meter, pisau, penggaris, lemari pendingin, toples kaca. Bahan – bahan yang digunakan adalah limbah kulit Pisang Raja yang diperoleh dari UKM Fronizka Indomedia Sukses, Desa Jatirejoyoso, Kepanjen, Kabupaten Malang, ZnSO_4 , DNS, aquades, *Aspergillus niger* yang diperoleh dari Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, beras, alkohol, Ca(OH)_2 , NaOH, asam oksalat, indikator PP.

3.3 Batasan Masalah

- Kulit pisang Raja diperoleh dari UKM Fronizka Indomedia Sukses, Kepanjen, Kabupaten Malang.
- Jenis kulit pisang yang digunakan adalah kulit pisang Raja setengah matang dengan umur 8 minggu.
- Penelitian dilakukan pada skala laboratorium.
- Pengujian yang dilakukan adalah pH, kadar asam sitrat dan total gula reduksi.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap non faktorial. Faktor atau variabel bebas adalah perlakuan yang diberikan dalam penelitian, yaitu konsentrasi ZnSO_4 dengan level sebagai berikut:

A1 : 2 ppm

A2 : 4 ppm

A3 : 6 ppm

A4 : 8 ppm

A5 : 10 ppm

Setiap perlakuan dilakukan 5 kali pengulangan sehingga diperoleh 25 kombinasi unit percobaan yang dapat dilihat pada **tabel 3.1**. Variabel terikat atau parameter yang diukur adalah nilai asam sitrat yang dihasilkan.

Tabel 3.1. Kombinasi Rancangan Acak Lengkap

Perlakuan	Pengulangan				
	I	II	III	IV	V
A1	A11	A12	A13	A14	A15
A2	A21	A22	A23	A24	A25
A3	A31	A32	A33	A34	A35
A4	A41	A42	A43	A44	A45
A5	A51	A52	A53	A54	A55

Untuk mengetahui apakah level penambahan mineral ZnSO_4 mempengaruhi nilai asam sitrat yang dihasilkan, maka dilakukan Analisis Variansi (ANOVA) berdasarkan Uji-F. Jika terdapat pengaruh atau respon yang signifikan sebagai akibat dari perlakuan yang diberikan, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (Uji BNT) untuk mengetahui perbedaan – perbedaan respon diantara ke lima level perlakuan.

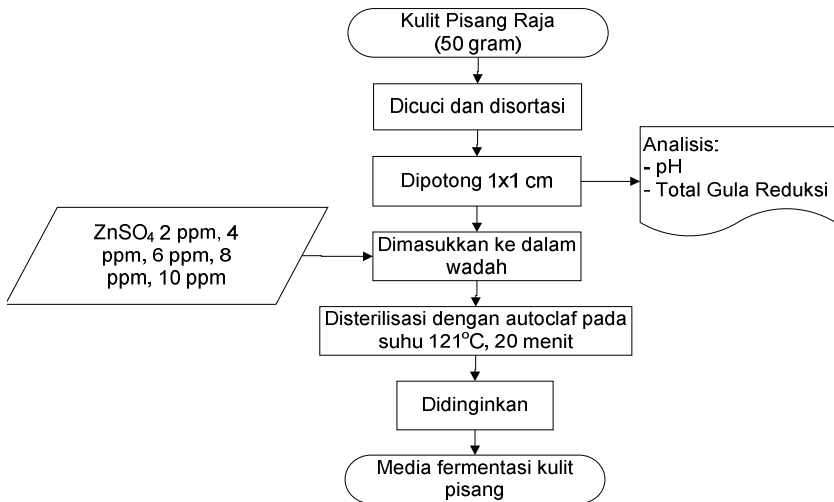
3.5 Pelaksanaan Penelitian

Produksi asam sitrat dengan menggunakan kulit pisang Raja terdiri dari beberapa tahapan yang meliputi pembuatan media fermentasi, pembuatan media beras, pembuatan starter *Aspergillus niger* dan proses fermentasi asam sitrat.

3.5.1 Pembuatan Media Fermentasi

Pembuatan media fermentasi dengan menggunakan substrat kulit pisang Raja dilakukan dengan langkah – langkah sebagai berikut:

1. Kulit pisang Raja dicuci dan disortasi, dipilih kulit pisang yang masih dalam kondisi segar, kemudian dipotong dengan ukuran 1x1 cm.
2. Kulit pisang Raja ditimbang sebanyak 50 gram dan dimasukkan ke dalam wadah.
3. Ditambahkan larutan ZnSO_4 dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm.
4. Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 20 menit lalu didinginkan pada suhu ruang.

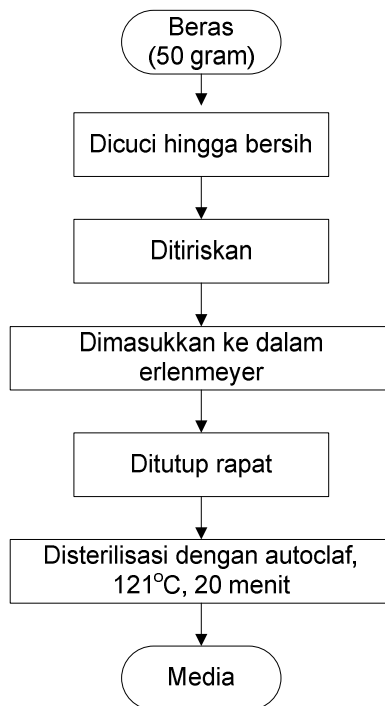


Gambar 3.1 Pembuatan media fermentasi

3.5.2 Pembuatan Media Beras

Pembuatan media beras dilakukan dengan langkah – langkah sebagai berikut:

1. Beras ditimbang 50 gr.
2. Beras dicuci menggunakan air hingga bersih lalu ditiriskan.
3. Beras dimasukkan dalam erlenmeyer dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 20 menit lalu didinginkan pada suhu ruang sekitar 15 menit.

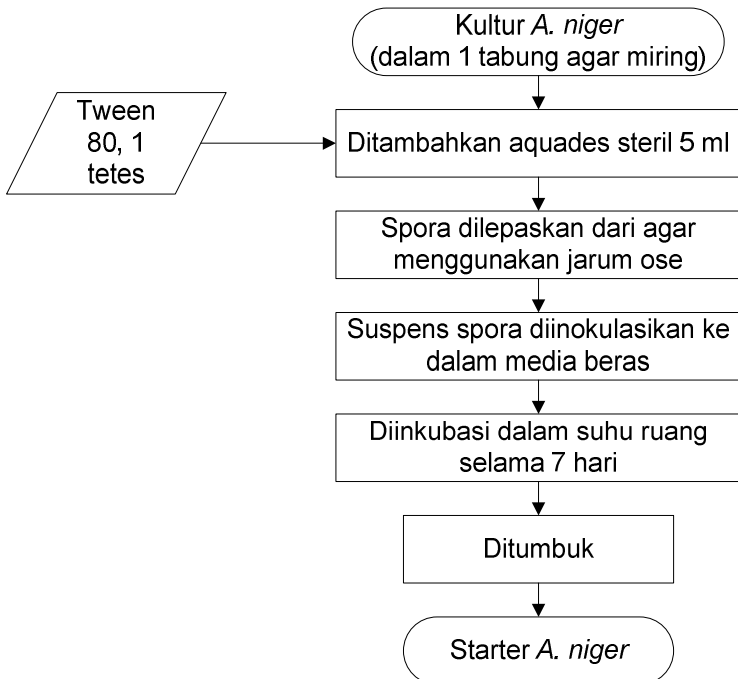


Gambar 3.2 Pembuatan media beras

3.5.3 Pembuatan Starter *Aspergillus niger*

Pembuatan starter *Aspergillus niger* dilakukan dengan langkah – langkah sebagai berikut:

1. Kultur *Aspergillus niger* dari media agar miring yang berumur 1 bulan, diberi aquades steril (telah diberi Tween 80) sebanyak 5 ml.
2. Dengan menggunakan ose, spora yang menempel pada agar dilepaskan.
3. Suspens spora dituang pada media beras dalam erlenmeyer dan diaduk hingga merata.
4. Diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari.
5. Media beras yang telah ditumbuhi *Aspergillus niger* ditumbuk dengan mortar hingga halus.

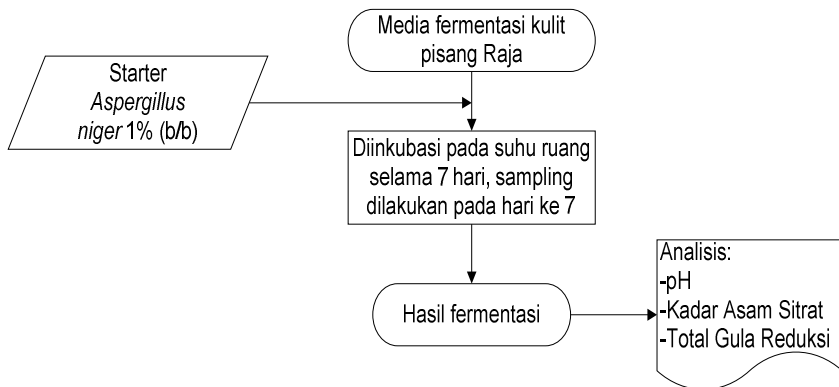


Gambar 3.3 Pembuatan starter *Aspergillus niger*

3.5.4 Proses Fermentasi Kulit Pisang

Proses fermentasi kulit pisang Raja dilakukan dengan langkah – langkah sebagai berikut:

1. Media fermentasi kulit pisang Raja ditambahkan starter *Aspergillus niger* 1% (b/b).
2. Diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang.
3. Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke 7 untuk di uji kadar asam sitrat, pH dan Total Gula Reduksi (TGR).



Gambar 3.4 Proses fermentasi kulit pisang Raja

3.6 Analisis Data

3.6.1 pH (SNI 06-6989.11-2004)

1. 5 gram sampel dihancurkan dan diaduk hingga homogen.
2. Lakukan kalibrasi alat pH-meter dengan larutan penyangga sesuai instruksi kerja alat setiap kali akan melakukan pengukuran.
3. Keringkan dengan kertas tisu selanjutnya bilas elektroda dengan air suling.
4. Celupkan elektroda ke dalam contoh uji sampai pH-meter menunjukkan pembacaan yang tetap.
5. Catat hasil pembacaan skala atau angka pada tampilan dari pH-meter.

3.6.2 Kadar Asam Sitrat (AOAC, 1995)

1. 10 gram sampel dihancurkan dan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml.
2. Ditambahkan aquades sampai tanda batas lalu dihomogenkan dan disaring.
3. Filtrat diambil 50 ml dimasukkan dalam erlenmeyer.
4. Ditambahkan indikator *phenolphthalein* 1% sebanyak 3 tetes.
5. Dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda. Kadar asam sitrat yang dihasilkan dapat diperoleh dari rumus:

$$\text{Kadar asam sitrat (\%)} = \frac{V \times N \times \text{BM asam sitrat} \times \text{fp}}{W \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan:

V = volume NaOH (ml)

W = berat sampel (gr)

N = normalisasi NaOH

fp = faktor pengenceran

3.6.3 Analisis Gula reduksi (Miller, 1959)

Berikut langkah-langkah pengujian total gula reduksi:

1. Dibuat larutan glukosa, larutan DNS, larutan campuran DNS dengan glukosa dan larutan campuran DNS dengan aquades.
2. Larutan stok glukosa dibuat dengan konsentrasi 1 mg/ml.
3. Larutan DNS dibuat dari 250 ml potasium sodium tartate (400mg/ml), 50 ml DNS (100mg/ml) dan 50 ml sodium hiroksida (200mg/ml) dan dilarutkan menjadi satu. Aquades ditambahkan hingga 500ml.
4. Larutan campuran DNS dengan glukosa, dilarutkan 1,8 ml larutan DNS dengan 1,8 ml glukosa (konsentrasi 1 mg/ml) pada tabung reaksi.
5. Larutan campuran DNS dengan aquades, dilarutkan 1,8 ml larutan DNS dengan 1,8 ml aquades.
6. Dibuat larutan standar gula reduksi. Konsentrasi standar glukosa disiapkan yaitu sebesar 0.0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml dan 1 mg/ml.

7. Larutan standar dibuat pada 6 tabung reaksi, dimasukkan larutan campuran DNS dan aquades masing-masing sebesar 500µl, 400µl, 300µl, 200µl, 100µl, dan 0µl.
8. Ditambahkan larutan campuran DNS dan glukosa masing-masing sebesar 0µl, 100µl, 200µl, 300µl, 400µl, dan 500µl.
9. Ditambahkan DNS 500µl kedalam masing-masing tabung reaksi.
10. Tabung reaksi dididihkan selama 15 menit pada *waterbath* dengan ditutup menggunakan alumunium foil.
11. Larutan diukur dengan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.
12. Absorbansi yang tertera pada Spektrofotometer dicatat kemudian dibuat kurva dengan sumbu x (konsentrasi) dan sumbu y (absorbansi) sehingga dihasilkan persamaan ($y = mx + c$). Berikut persamaan yang dihasilkan pada kurva larutan standar glukosa:

$$y = mx + c$$

Keterangan :

y = absorbansi

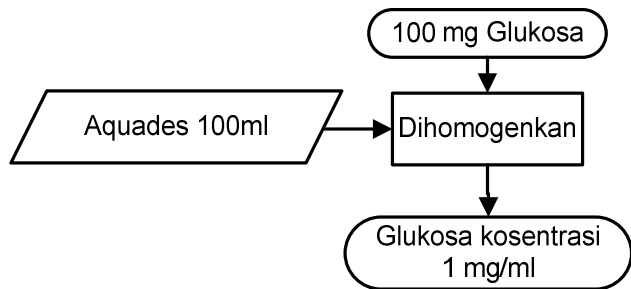
m = gradient

x = gula reduksi (mg/ml)

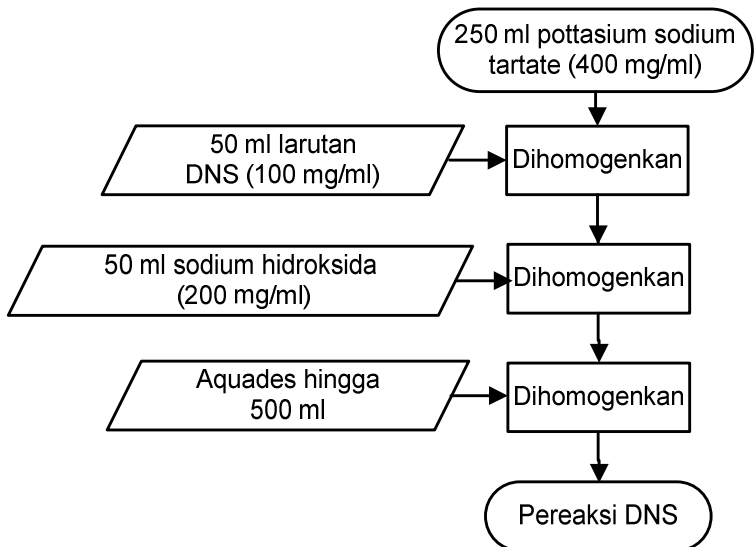
c = konstanta

13. Pengukuran gula reduksi pada hasil ekstrak kulit pisang yaitu, 750 µl DNS ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi yang sebelumnya telah dimasukkan 250 µl ekstrak kulit pisang Raja.
14. Tabung reaksi dididihkan selama 15 menit pada *waterbath* dengan ditutup menggunakan alumunium foil.
15. Diukur absorbansi dengan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.
16. Absorbansi yang didapatkan, disubstitusikan ke dalam rumus (y) sehingga kadar gula reduksi (x) dapat diketahui.

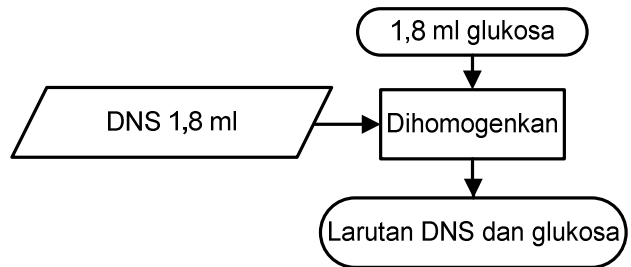
A. Pembuatan Larutan Glukosa



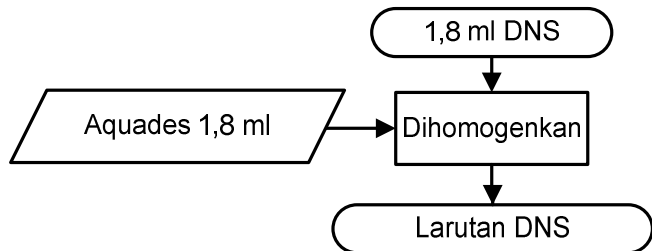
B. Pembuatan Larutan DNS



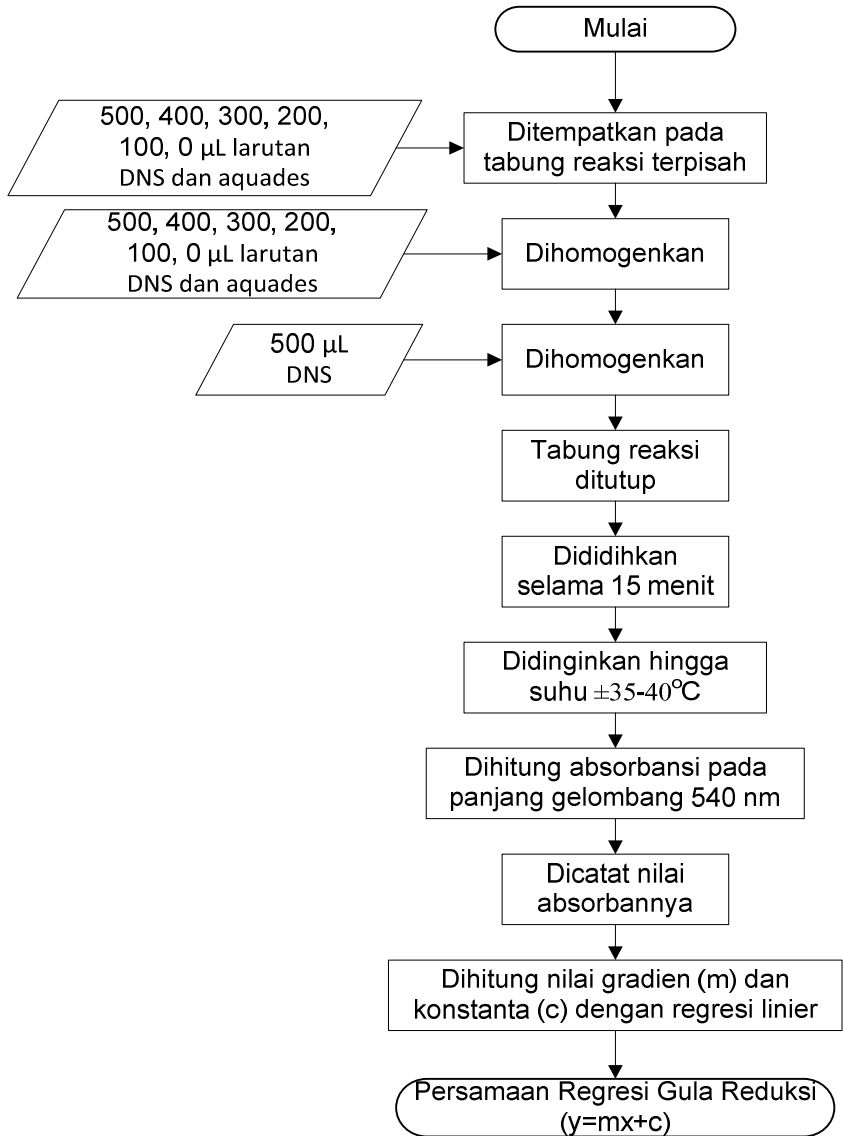
C. Pembuatan Larutan DNS dengan Glukosa



D. Pembuatan Larutan DNS dengan Aquades



E. Pembuatan dan Pengukuran Larutan Standar Gula Reduksi



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kadar Asam Sitrat Hasil Fermentasi

Hasil analisis ragam (ANOVA) (**Lampiran 4**) menunjukkan terdapat beda nyata pada setiap level konsentrasi ZnSO_4 terhadap kadar asam sitrat. Kadar asam sitrat hasil fermentasi dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1. Pengaruh konsentrasi ZnSO_4 terhadap kadar asam sitrat (%) hasil fermentasi 7 hari

Konsentrasi ZnSO_4 (ppm)	Rata-rata Kadar Asam Sitrat (%)	Nilai BNT ($\alpha=5\%$)
2	18,82 ^a	2,57
4	21,12 ^{ab}	
6	21,50 ^{bc}	
8	23,81 ^c	
10	26,62 ^d	

Keterangan: Notasi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat beda nyata antar perlakuan melalui uji BNT ($\alpha=5\%$)

Data hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan kadar asam sitrat pada setiap perlakuan konsentrasi ZnSO_4 . Kadar asam sitrat terendah terdapat pada media fermentasi dengan penambahan konsentrasi ZnSO_4 sebesar 2 ppm yaitu sebesar 18,82%. Kadar asam sitrat semakin meningkat seiring bertambahnya konsentrasi ZnSO_4 pada media fermentasi hingga mencapai nilai tertinggi pada konsentrasi ZnSO_4 10 ppm dengan kadar asam sitrat sebesar 26,62%. Hasil tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan Tran, dkk (1998) yang melaporkan penambahan ZnSO_4 sebesar 2 ppm sampai 10 ppm dapat meningkatkan kadar asam sitrat dari 15,40% menjadi 16,80%. Dari hasil tersebut mengindikasikan peran ZnSO_4 dalam produksi asam sitrat.

Konsentrasi ZnSO_4 memberikan pengaruh nyata terhadap kadar asam sitrat, dikarenakan perannya dalam metabolisme

sel dan perombakan nutrisi sebagai sumber energi *Aspergillus niger* dalam akumulasi asam sitrat. Peran tersebut dilakukan dengan mendukung kinerja enzim fosfofruktokinase dalam merombak fruktose-6-P menjadi fruktose-1,6-bisP pada tahap glikolisis (Papagianni, 2007). Sehingga dalam kadar ZnSO_4 yang optimal dapat mendukung produksi asam sitrat (Wold dan Suzuki, 1976a).

4.2 Nilai pH Hasil Fermentasi

Nilai pH pada setiap perlakuan penambahan ZnSO_4 tidak menunjukkan beda nyata (**Lampiran 1**). Hasil analisis pengaruh konsentrasi ZnSO_4 terhadap derajat keasaman disajikan dalam **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2. Pengaruh konsentrasi ZnSO_4 terhadap pH hasil fermentasi 7 hari

Konsentrasi ZnSO_4 (ppm)	Rata-rata pH	Nilai BNT ($\alpha=5\%$)
2	3,21 ^a	0,04
4	3,20 ^a	
6	3,20 ^a	
8	3,21 ^a	
10	3,22 ^a	

Keterangan: Notasi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat beda nyata antar perlakuan melalui uji BNT ($\alpha=5\%$)

Data hasil penelitian menunjukkan level konsentrasi ZnSO_4 yang ditambahkan pada substrat fermentasi tidak memberikan perbedaan nilai pH pada hasil akhir fermentasi. Sebelum proses fermentasi, diketahui bahwa pH medium sebesar 6,5 kemudian menurun pada fermentasi hari ke-7 sebesar 3,2. Penurunan pH selama waktu fermentasi 7 hari mengindikasikan terbentuknya asam sitrat. pH pada media dapat mempengaruhi produksi asam sitrat dari *Aspergillus niger* karena beberapa enzim yang berperan dalam siklus Krebs sensitif terhadap pH, dimana *Aspergillus niger* aktif menghasilkan asam sitrat pada rentang pH 2,5 – 3,5 (Sasmitaloka, 2017; Syamsuriputra, dkk, 2006).

Level konsentrasi ZnSO_4 memberikan nilai pH konstan atau sama pada hasil akhir fermentasi disetiap perlakuan diduga karena adanya aksi penyangga pH dan terbentuk asam-asam lemah yang membentuk buffer (Carolina, dkk., 2015).

4.3 Nilai Gula Reduksi Hasil Fermentasi

Hasil analisis ragam (ANOVA) dan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (**Lampiran 3**) menunjukkan terdapat beda nyata pada level perlakuan konsentrasi ZnSO_4 terhadap nilai Total Gula Reduksi (TGR). Hasil analisis pengaruh konsentrasi ZnSO_4 terhadap nilai Total Gula Reduksi (TGR) dapat dilihat pada **Tabel 4.3**.

Tabel 4.3. Pengaruh konsentrasi ZnSO_4 terhadap nilai TGR (mg/g) hasil fermentasi 7 hari

Konsentrasi ZnSO_4 (ppm)	Rata-rata Nilai TGR (mg/g)	Nilai BNT ($\alpha=5\%$)
2	159,0 ^{ab}	27,6
4	167,5 ^{ab}	
6	144,4 ^a	
8	173,7 ^b	
10	164,1 ^{ab}	

Keterangan: Notasi huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat beda nyata antar perlakuan melalui uji BNT ($\alpha=5\%$)

Nilai TGR terendah terdapat pada konsentrasi ZnSO_4 6 ppm yaitu sebesar 144,4 mg/g, kemudian mencapai nilai tertinggi pada konsentrasi ZnSO_4 8 ppm sebesar 173,7 mg/g. Porges (1932) menyebutkan bahwa ZnSO_4 memberikan efek secara nyata dalam meningkatkan hasil dari asam sitrat per unit glukosa yang dikonsumsi oleh *Aspergillus niger*. Peran tersebut dapat dilihat dari data hasil penelitian yang menunjukkan terdapat kenaikan nilai TGR selama waktu fermentasi 7 hari.

Sebelum proses fermentasi, diketahui nilai TGR medium sebesar 98,3 mg/g kemudian pada fermentasi hari ke-7 naik menjadi 173,7 mg/g pada nilai TGR tertinggi. Nilai TGR awal lebih rendah daripada nilai TGR akhir hasil fermentasi

dikarenakan *Aspergillus niger* selama fermentasi merombak pati menjadi gula reduksi, sehingga nilai TGR akhir fermentasi lebih tinggi. Nilai TGR terendah (144,4 mg/g) pada hasil fermentasi mengindikasikan konsumsi gula reduksi yang lebih banyak dibandingkan dengan nilai TGR tertinggi (173,7 mg/g), hal tersebut dikarenakan gula reduksi yang dipecah dari pati telah dikonsumsi oleh *Aspergillus niger*. Penelitian yang dilakukan oleh Moyer (1953), melaporkan bahwa penambahan 10 ppm ZnSO_4 pada media mampu meningkatkan konsumsi glukosa dari 10,46 mg/g perlakuan kontrol menjadi 10,95 mg/g konsumsi glukosa pada produksi asam sitrat menggunakan *Aspergillus niger*. Nilai TGR turun kemudian naik pada konsentrasi ZnSO_4 yang lebih tinggi, menunjukkan pengaruh nyata ZnSO_4 terhadap metabolisme sel dalam merombak glukosa menjadi piruvat oleh *Aspergillus niger*.

4.4 Perlakuan Terbaik

Perlakuan terbaik ditentukan dengan memberikan nilai ideal pada parameter-parameter yang diuji berdasarkan analisis *multiple atribut* (Zeleny, 1982). Parameter yang memiliki nilai ideal maksimal adalah kadar asam sitrat dan parameter yang memiliki nilai ideal minimal adalah Total Gula Reduksi (TGR). Hal tersebut dengan pertimbangan bahwa semakin rendah konsentrasi gula pereduksi total hasil fermentasi maka semakin tinggi tingkat konsumsi gula reduksi oleh *Aspergillus niger*, sehingga diharapkan menghasilkan asam sitrat semakin banyak (Carolina, dkk., 2015). Perlakuan dengan jarak kerapatan maksimal terkecil merupakan perlakuan terbaik dari hasil analisis. Derajat kerapatan dihitung berdasarkan nilai ideal dari masing-masing parameter. Jarak kerapatan dihitung berdasarkan jumlah parameter pada masing-masing perlakuan. Proses perhitungan dan pemilihan perlakuan terbaik disajikan dalam **Lampiran 6**. Hasil pemilihan perlakuan terbaik dapat dilihat pada **Tabel 4.4**.

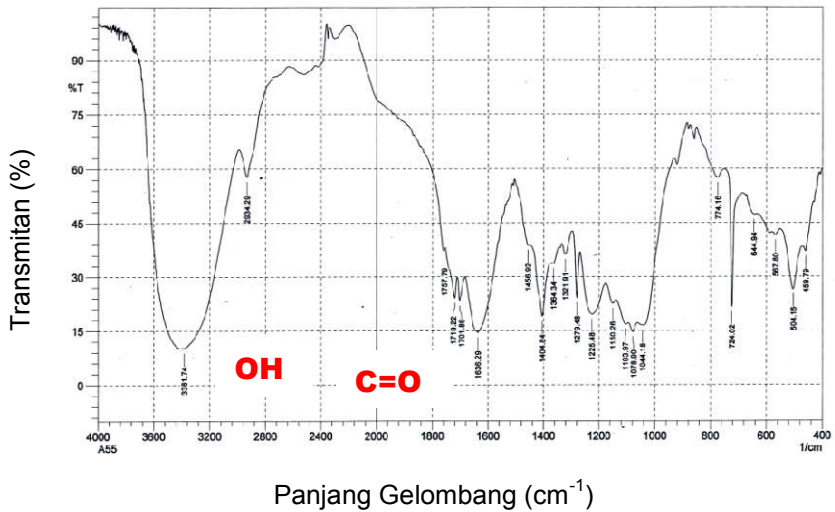
Tabel 4.4. Pemilihan perlakuan terbaik

Konsentrasi ZnSO ₄ (ppm)	Derajat Kerapatan		Jarak Kerapatan			Perlakuan Terbaik
	Kadar Asam Sitrat	Total Gula Reduksi	L1	L2	L~	
2	0,733	0,733	0,267	0,036	0,133	Penambahan ZnSO ₄ 10 ppm
4	0,733	0,701	0,283	0,040	0,150	
6	0,800	0,894	0,153	0,013	0,100	
8	0,867	0,679	0,227	0,030	0,160	
10	1,000	0,833	0,083	0,007	0,083	

Hasil perlakuan terbaik didapatkan pada sampel dengan perlakuan penambahan ZnSO₄ sebesar 10 ppm. Perlakuan terbaik diperoleh dengan hasil kadar asam sitrat 26,62% dan nilai TGR 164,10 mg/g. Hal tersebut diperoleh dari hasil perhitungan perlakuan terbaik dengan menggunakan kedua parameter tersebut, sehingga didapatkan jarak kerapatan maksimal terkecil.

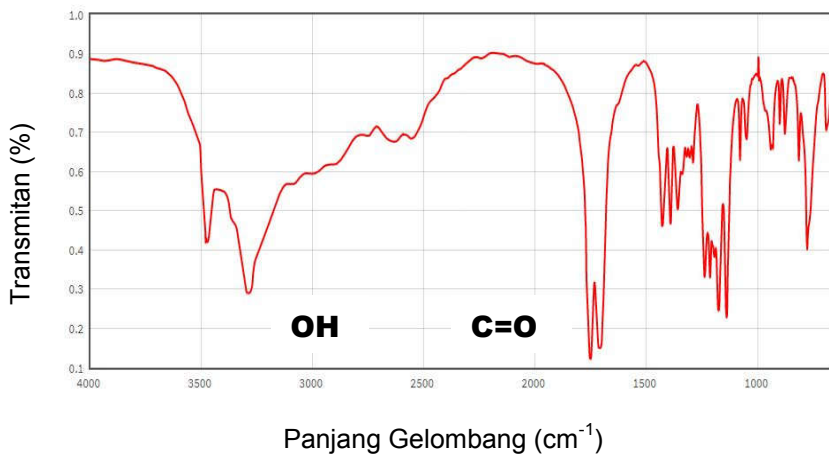
4.5 Analisa Gugus Fungsi dengan Metode FTIR

Hasil perlakuan terbaik dilakukan analisa gugus fungsi dengan metode FTIR. Spektrum inframerah dari ekstrak kulit Pisang Raja hasil fermentasi oleh *Aspergillus niger* ditunjukkan pada **Gambar 4.1**.



Gambar 4.1 Spektrum inframerah ekstrak kulit pisang Raja hasil fermentasi oleh *Aspergillus niger*

Sebagai perbandingan, berikut ini adalah spektrum infra merah asam sitrat pada **Gambar 4.2**.



Gambar 4.2 Spektrum inframerah asam sitrat (Anonym, 2017)

Hasil pengukuran ekstrak kulit pisang hasil fermentasi dengan spektrofotometer FTIR menunjukkan 22 pita serapan (**Lampiran 7**). Data spektrum dan gugus fungsinya ditampilkan pada **Tabel 4.5**.

Tabel 4.5. Data spektrum inframerah dari ekstrak kulit Pisang Raja hasil fermentasi

No	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		Bentuk Pita	Intensitas	Gugus Fungsional
	Ekstrak	Pustaka*			
1	3381,74	2400-3400	Melebar	Kuat	O-H
2	2943,29	2850-3000	Melebar	Sedang	C-H
3	1757,79	1650-1800	Melebar	Kuat	C=O
4	1719,22	1700-1730	Melebar	Kuat	C=O
5	1701,86	1700-1730	Melebar	Kuat	C=O
6	1456,92	1300-1470	Melebar	Sedang	C-O
7	1404,84	1300-1470	Melebar	Kuat	C-O
8	1279,48	1210-1320	Melebar	Kuat	C-O
9	1225,48	1210-1320	Melebar	Kuat	C-O
10	1150,26	1000-1300	Melebar	Kuat	C-O
11	1103,97	1000-1300	Melebar	Kuat	C-O
12	1078,90	1000-1300	Melebar	Kuat	C-O
13	1044,18	1000-1300	Melebar	Kuat	C-O

***Sumber:** Donald, dkk., 2015

Pada data spektrum inframerah, terlihat adanya serapan pada bilangan gelombang 3381,74 cm⁻¹ dengan intensitas kuat dan melebar, yang diduga adalah serapan O-H asam. Dugaan ini diperkuat dengan adanya tiga gugus karbonil (C=O) yang muncul pada bilangan gelombang 1650-1800 cm⁻¹ (Donald, dkk., 2015). Dimana pada daerah bilangan tersebut terdapat serapan bilangan gelombang 1701,86 cm⁻¹, 1719 cm⁻¹ dan 1757,79 cm⁻¹ dengan intensitas kuat dan melebar yang dihasilkan oleh serapan C=O. Serapan dengan intensitas kuat dan melebar pada bilangan gelombang 1225,48 cm⁻¹ dan 1279,48 cm⁻¹ dihasilkan oleh gugus C-O.

Dari penjelasan data spektrum inframerah tersebut, dapat disimpulkan bahwa terdapat asam karboksilat pada hasil fermentasi kulit pisang Raja. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya gugus karbonil (C=O) pada bilangan gelombang 1700-

1730 cm^{-1} , didukung dengan adanya serapan O-H dengan intensitas kuat dan melebar pada bilangan gelombang 2400-3400 cm^{-1} yang *overlap* dengan serapan C-H, dan terdapat serapan C-O pada bilangan gelombang 1210-1320 cm^{-1} (Donald, dkk., 2015). Terdapatnya asam karboksilat pada ekstrak kulit pisang Raja hasil fermentasi oleh *Aspergillus niger* semakin memperkuat adanya kandungan asam sitrat, hal tersebut didukung dengan adanya tiga gugus karbonil yang muncul pada bilangan gelombang 1650-1800 cm^{-1} yang identik dengan asam trikarboksilat, dimana menurut Max, dkk. (2010) asam sitrat merupakan asam trikarboksilat.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

1.1 Kesimpulan

Penambahan mineral ZnSO_4 sebagai sumber seng (Zn) mampu meningkatkan hasil fermentasi asam sitrat dengan bantuan *Aspergillus niger* menggunakan substrat kulit Pisang Raja. Penambahan konsentrasi optimal ZnSO_4 adalah 10 ppm. Dalam 7 hari fermentasi didapat kadar asam sitrat 26,62%, total gula reduksi 164,10 mg/g, dan pH 3,22. Hasil analisa spektroskopi inframerah (FTIR) pada sampel perlakuan terbaik teridentifikasi terdapat kandungan asam sitrat.

1.2 Saran

Berdasarkan hasil pengamatan yang diperoleh selama penelitian, dapat diambil saran sebagai berikut:

1. Melakukan proses pemurnian asam sitrat hasil fermentasi sehingga diperoleh asam sitrat murni.
2. Melakukan optimasi fermentasi asam sitrat dengan substrat kulit Pisang Raja menggunakan metode *Response Surface Method* (RSM).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonym. 2017. **Citric Acid**. Dilihat 1 Februari 2018. <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C77929&Mask=80>>.
- Abbas, N., Wardah, S., Sakhawat, A., Shahnaz, C., dan Sana, I. 2016. **Citric Acid Production from *Aspergillus niger* Using Banana Peel**. International Journal of Scientific & Engineering Research. 7: 1580-1583.
- Akram, M. 2014. **Citric Acid Cycle and Role of Its Intermediate in Metabolism**. Cell Biochem Biophys. 68: 475-478.
- Anonym. 2004. **SNI 06-6989.11-2004 : Air dan Air Limbah – Bagian 11: Cara Uji Derajat Keasaman (pH) dengan Menggunakan alat pH Meter**. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Angumeenal, A.R., dan Venkappaya, D. 2013. **An Overview of Citric Acid Production**. LWT – Food Science and Technology. 50: 367 – 570.
- Anhwange, B.A. 2008. **Chemical Composition of *Musa sapientum* (Banana) Peels**. Journal of Food Technology. 6: 263-266.
- AOACC. 1995. **Official Methods of Analysis 16th**. Ed. The Association of Official Analytical Chemists. Washington DC.
- Apelblat, A. 2014. **Citric Acid**. Springer. London.
- Baker, S.E. 2006. ***Aspergillus niger* genomics: Past, Present and Into the Future**. Medical Mycology. 44: 517-521.
- Bhargav, S., Panda, B.P., Ali, M., dan Javed, S. 2008. **Solid-state Fermentation: An Overview**. Chem. Biochem. Eng. Q. 22: 49-70.

- Carolina, A., Abubakar, S., Iman, P.M., Saadah, D.R., Agus S., Safri, I. 2015. **Fermentasi Biak Rendam Molases dengan *Aspergillus niger* untuk Produksi Asam Sitrat.** *Chimica et Natura Acta*. 3: 25 - 29.
- Cevrimli, B.S., Ergin, K., dan Harun, C. 2009. **Effects of Fermentation Conditions on Citric Acid Production from Beet Molasses by *Aspergillus niger*.** *Asian Journal of Chemistry*. 21: 3211 – 3218.
- Chutmanop, J., Sinsupha, C., Yusuf, C., dan Penjit, S. 2008. **Protease Production by *Aspergillus oryzae* in Solid-state Fermentation Using Agroindustrial Substrates.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83: 1012-1018.
- Couto, S.R., dan M. Angeles, S. 2006. **Application of Solid-State Fermentation to Food Industry – A Review.** *Journal of Food Engineering*. 76: 291-302.
- Dhillon, G.S., Satinder, K.B, dan Surinder, K. 2013. **Bioproduction and Extraction Optimization of Citric Acid from *Aspergillus niger* by Rotating Drum Type Solid-state Bioreactor.** *Industrial Crops and Products*. 41: 78-84.
- Donald, L., Pavia, Gary, M.L., George, S.K., James, A.V. 2015. **Introduction to Spectroscopy.** Cengage Learning. Stamford.
- Essien, J.P., E.J. Akpan, E.P. Essien. 2005. **Studies on Mould Growth and Biomass Production Using Waste Banana Peel.** *Bioresource Technology*. 96: 1451-1456.
- Gautam, A.K., dan Bhadauria, R. 2012. **Characterization of *Aspergillus* Species Associated with Commercially Stored Triphala Powder.** *African Journal of Biotechnology*. 11: 16814-16823.
- Gebregergs, A., Mebrahtom, G., dan Omprakash, S. 2016. **Industrial Ethanol from Banana Peels for Developing Countries: Response Surface Methodology.** *Pasific*

Science Review A: Natural Science and Engineering. 18: 22-29.

- Gopi, D., Kanimozhi, K., Bhuvaneshwari, N., Indira, J., dan Kavitha, L. 2014. **Novel Banana Peel Pectin Mediated Green Route for The Synthesis of Hydroxyapatite Nanoparticles and Their Spectral Characterization.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 118: 589-597.
- Guilherme A.A., G.A.S. Pinto, S. Rodrigues. 2007. **Optimization of Trace Metals Concentration on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 2001.** Food Bioprocess Technology. 1: 246-253.
- Habison, A., Christian, P.K., dan Max, R. 1983. **Partial Purification and Refulatory Properties of Phosphofructokinase from *Aspergillus niger*.** Biochem. J. 209: 669-676.
- Hang, Y.D., dan Woodams, E.E. 1998. **Production of Citric Acid from Corncob by *Aspergillus niger*.** Bioresource Technology. 65: 251-253.
- Hanum, F., Martha, A.T., dan Irza, M.D.K. 2012. **Ekstraksi Pektin dari Kulit Buah Pisang Kepok (*Musa paradisiaca*).** Jurnal Teknik Kimia USU. 49-53.
- Kareem, S.O dan Rahman, R.A. 2013. **Utilization of Banana Peels for Citric Acid Production by *Aspergillus niger*.** Agriculture and Biology Journal of North America. 4: 384-387.
- Karthikeyan, A., dan Nallusamy, S. 2010. **Citric Acid Production by Koji Fermentation Using Banana Peel as A Novel Substrate.** Bioresource Technology. 101: 5552-5556.
- Khawas, P., Arup, J.D., Sankar, C.D. 2016. **Production of Renewable Cellulose Nanopaper from Culinary Banana (*Musa ABB*) Peel and its Characterization.** Industrial Crops and Products. 86: 102-112.

- Kirk dan Othmer. 2008. **Food and Feed Technology: 2 Volume set**. John Wiley & Sona Inc. Hoboken.
- Kusmiati dan Ni Wayan S.A. 2010. **Pemanfaatan Limbah Onggok Untuk Produksi Asam Sitrat Dengan Penambahan Mineral Fe dan Mg Pada Substrat Menggunakan Kapang *Trichoderma sp.* dan *Aspergillus niger***. Seminar Nasional Biologi 2010. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Bogor.
- Lii, C.Y., Chang, S.M., dan Young, Y.L. 1982. **Investigation of The Physical and Chemical Properties of Banana Starches**. Journal of Food Science. 47: 1493-1497.
- Liu, X., Xinfeng, W., Jiaying, X., Jun, X., Jinshun, L., Tong, Z., Zhen, W., Yuanfang, D., dan Jianlong, H. 2015. **Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b Using Corn Steep Liquor as A Source of Organic Nitrogen and Vitamins**. Industrial Crops and Products. 78: 154-160.
- Lu, M.Y., Maddox, I.S., dan Brooks, J.D. 1995. **Citric Acid Production by *Aspergillus niger* in Solid-Substrate Fermentation**. Bioresource Technology. 54: 235 – 239.
- Lu, M., John, D.B., dan Ian, S.M. 1997. **Citric Acid Production by Solid-State Fermentation in A Packed-bed Reactor Using *Aspergillus niger***. Enzyme and Microbial Technology. 21: 392-397.
- Max, dkk. 2010. **Biotechnological Production of Citric Acid**. Brazilian Journal of Microbiology. 41: 862-875.
- Memon, J.R., Saima, Q.M., Muhammad, I.B., Adel, E.T., Keith, R.H., dan Geoffrey, C.A. 2009. **Banana Peel: A Green and Economical Sorbent for the Selective Removal of Cr(VI) from Industrial Wastewater**. Colloids and Surface B: Biointerfaces. 70: 232-237.
- Miller, G.L. 1959. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar**. Journal of Analytical Chemistry. 31: 300-310.

- Mohapatra, D., Sabyasachi, M., dan Namrata, S. 2010. **Banana and Its By-product Utilisation: An Overview**. Journal of Scientific & Industrial Research. 69: 323 – 329.
- Moreno, J., dan Rafael, P. 2012. **Enological Chemistry**. Elsevier Inc. Madrid.
- Moresi, M., dan Parente, E. 2014. **Production of Some Organic Acids (Citric, Gluconic, Lactic, and Propionic)**. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). 1: 804 – 815.
- Mosa, Z.M., dan Ayman, F.K. 2015. **The Effect of Banana Peels Supplemented Diet on Acute Liver Failure Rats**. Annals of Agricultural Science. 60: 373-379.
- Moyer, A.J. 1953. **Effect of Alcohols on the Mycological Production of Citric Acid in Surface and Submerged Culture**. Applied Microbiology. 1: 1-7.
- Najafpour, G.D. 2015. **Chapter 12 – Production of Citric Acid**. Biochemical Engineering and Biotechnology. 363-373.
- Nathoa, C., Ubonratm S., dan Nipon, P. 2014. **Production of Hydrogen and Methane from Banana Peel by Two Phase Anaerobic Fermentation**. Energy Procedia. 50: 702-710.
- Papagianni, M. 2007. **Advances in Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger* : Biochemical Aspects, Membrane Transport and Modeling**. Biotechnology Advances. 25: 244-263.
- Pisutpaisal, N., Siriorn, B., dan Haosagul, S. 2014. **Feasibility of Biomethane Production from Banana Peel**. Energy Procedia. 50: 782-788.
- Porges, N. 1932. **Citric Acid Production By *Aspergillus niger***. American Journal of Botany. 19: 559-567.
- Prado, F.C., Vandenberghe, L.P.S, Woiciechowski, A.L, Leon, J.A.R., dan Soccol, C.R. 2005. **Citric Acid Production by Solid-State Fermentation on A Semi-Pilot Scale**

Using Different Percentages of Treated Cassava Bagasse. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 22: 547 – 555.

Ramachandra, Y.L., Narayanamurthy, G., Sreepad, J., Ashajyothi, C., dan Padmalatha, R.S. 2013. **Production of Citric Acid in Basal Coffee Husk Medium by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation.** Advances in Biological Research. 7: 234-240.

Roukas, T. 1998. **Carob Pod: A New Substrate for Citric Acid Production by *Aspergillus niger*.** Applied Biochemistry and Biotechnology. 74: 43-53.

Sasmitaloka, K.S. 2017. **Produksi Asam Sitrat oleh *Aspergillus niger* Pada Kultivasi Media Cair.** Jurnal Integrasi Proses. 6: 116-122.

Shankaranand, V.S dan Lonsane B.K. 1992. **Ability of *Aspergillus niger* to Tolerate Metal Ions and Minerals in a Solid-State Fermentation System for the Production of Citric Acid.** Process Biochemistry. 29: 29 – 37.

Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., dan Pandey, A. 2006. **New Perspectives for Citric Acid Production and Application.** Food Technol. Biotechnol. 44: 141 – 149.

Swamy, G.J., dan Kasiviswanathan, M. 2017. **Optimization of Continuous and Intermittent Microwave Extraction of Pectin from Banana Peels.** Food Chemistry. 220: 108-114.

Syamsuriputra, A., Tjandra, S., Ratih, K., dan Rita F. 2006. **Pengaruh Kadar Air Substrat dan Konsentrasi Dedak Padi Pada Produksi Asam Sitrat Dari Ampas Tapioka Menggunakan *Aspergillus Niger* ITBCCI74.** Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia 2006, Palembang, 19-20 Juli 2006.

- Tanyildizi, M.S., Dursun, O., dan Murat, E. 2007. **Production of Bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* Under Solid Substrate Fermentation.** Biochemical Engineering Journal. 37: 294-297.
- Tibolla, H., Franciele, M.P., dan Florencia, C.M. 2014. **Cellulose Nanofibers Produced from Banana Peel by Chemical and Enzymatic Treatment.** LWT – Food Science and Technology. 30: 1-8.
- Tran, C.T., Sly, L.I., dan Mitchell, D.A. 1998. **Selection of A Strain of *Aspergillus* for The Production of Citric Acid From Pineapple Waste in Solid-state Fermentation.** World Journal of Microbiology & Biotechnology. 14: 339-404.
- Tritanti, A., dan Ika, P. 2015. **Limbah Kulit Pisang Sebagai Alternatif Pengganti Pewarna Sintetis Pada Bedak Tabur.** Jurnal Pendidikan Teknologi dan Kejuruan. 22: 239-249.
- Vandenbergh, L.P.S., Rodrigues, C., Medeiros, A.B.P., dan Soccol, C.R. 2017. **Production and Application of Citric Acid • dalam Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.** Elsevier. Oxford.
- Wold, W.S.M dan Suzuki, I. 1976a. **Regulation by Zinc and Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate of Growth and Citric Acid Accumulation in *Aspergillus niger*.** Can. J. Microbiol. 22: 1093-1101.
- Wold, W.S.M dan Suzuki, I. 1976b. **The Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger*.** Can. J Microbiol. 22: 1083-1092.
- Yang, L., Mette, L., dan Peter, S.L. 2016. ***Aspergillus* as A Versatile Cell Factory for Organic Acid Production.** Fungal Biology Reviews. 30: 1-17.
- Zafiris, G.A., Constantina, T., Vassiliki, O., dan Christos, D.T. 1994. **Fermentation of Orange Processing Wastes for Citric Acid Production.** J Sci Food Agric. 65: 117-120.

Zeleny, M. 1982. **Multiple Criteria Decision Making**. McGraw-Hill Co. New York.

Lampiran 1. Data pH

Tabel pH

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
A1	3,17	3,21	3,22	3,18	3,25	16,03	3,21
A2	3,21	3,19	3,23	3,19	3,19	16,01	3,20
A3	3,22	3,24	3,20	3,15	3,17	15,98	3,20
A4	3,24	3,24	3,16	3,20	3,20	16,04	3,21
A5	3,30	3,24	3,19	3,20	3,17	16,10	3,22
Total	16,14	16,12	16,00	15,92	15,98	80,16	
Rata-rata							3,21

Tabel Sidik Ragam pH

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	F hitung	F tabel 0,05
Perlakuan	4	0,002	0,000	0,305	2,870
Galat	20	0,026	0,001		
Total	24	0,027			

Keterangan: F hitung < F tabel menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Tabel Uji BNT

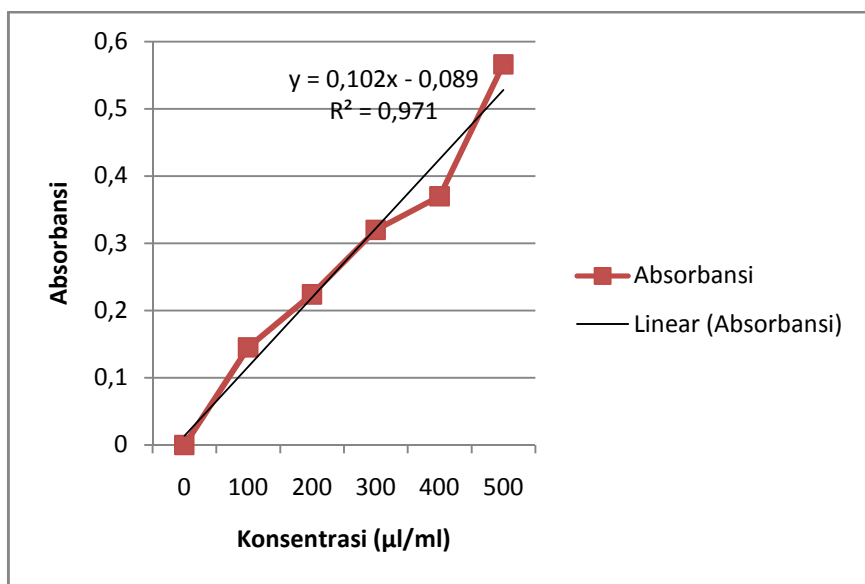
Konsentrasi ZnSO4 (ppm)	Rerata Nilai pH	BNT (5%)
2	3,21 ^a	
4	3,20 ^a	
6	3,20 ^a	0,04
8	3,21 ^a	
10	3,22 ^a	

Lampiran 2. Kurva Standar Total Gula Reduksi

Tabel Absorbansi Standar TGR

Konsentrasi ($\mu\text{l/ml}$)	Absorbansi
0	0
100	0,145
200	0,224
300	0,320
400	0,370
500	0,566

Kurva Standar TGR



Lampiran 3. Data Total Gula Reduksi (TGR)

Tabel Total Gula Reduksi (mg/g)

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
A1	170	185	149	150	141	795	159,00
A2	161	157	176	167	178	839	167,80
A3	143	110	123	150	195	721	144,20
A4	162	181	177	162	186	868	173,60
A5	186	184	145	174	132	821	164,20
Total	822	817	770	803	832	4044	
Rata-rata							161,76

Tabel Sidik Ragam Total Gula Reduksi

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	F hitung	F tabel 0,05
Perlakuan	4	2493,0	623,2	1,4	2,9
Galat	20	8729,6	436,5		
Total	24	11222,6			

Keterangan: F hitung < F tabel menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Tabel Uji BNT

Konsentrasi ZnSO ₄ (ppm)	Rerata Nilai TGR	BNT (5%)
2	159,0 ^{ab}	
4	167,8 ^{ab}	
6	144,2 ^a	27,6
8	173,6 ^b	
10	164,2 ^{ab}	

Lampiran 4. Data Kadar Asam Sitrat

Tabel Data Kadar Asam Sitrat (%)

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
A1	19,20	17,28	19,20	21,12	17,28	94,08	18,82
A2	19,20	21,12	19,20	21,12	24,96	105,60	21,12
A3	19,20	19,20	23,00	23,04	23,04	107,50	21,50
A4	21,12	23,04	25,00	24,96	24,96	119,00	23,81
A5	26,88	26,88	26,90	23,64	28,80	133,10	26,62
Total	105,60	107,50	113,00	113,90	119,00	559,30	
Rata-rata							22,37

Tabel Sidik Ragam Kadar Asam Sitrat

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	F hitung	F tabel 0,05
Perlakuan	4	175,20	43,80	11,56	2,87
Galat	20	75,77	3,79		
Total	24	250,97			

Keterangan: F hitung > F tabel menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5%

Tabel Uji BNT

Konsentrasi ZnSO ₄ (ppm)	Rerata Kadar Asam Sitrat	BNT (5%)
2	18,82 ^a	
4	21,12 ^{ab}	
6	21,50 ^{bc}	2,57
8	23,81 ^c	
10	26,62 ^d	

Lampiran 5. Pemilihan Perlakuan Terbaik

Prosedur pemilihan alternatif terbaik menggunakan metode *Multiple Attribute* (Zelleny, 1982) :

- a. Penentuan nilai ideal pada masing-masing parameter. Nilai ideal adalah nilai yang diharapkan. Asumsi ideal untuk setiap parameter adalah :

Kadar asam sitrat : tertinggi

Total gula reduksi : terendah

- b. Penentuan derajat kerapatan.

Bila nilai ideal dinotasikan sebagai (d^k_i) minimal, maka :

$$d^k_i = \frac{\text{nilai kenyataan yang mendekati ideal } (X_i)}{\text{nilai ideal masing-masing alternatif } (X_{ki})}$$

Bila nilai ideal dinotasikan sebagai (d^k_i) maksimal, maka :

$$d^k_i = \frac{\text{nilai ideal masing-masing alternatif } (X_{ki})}{\text{nilai kenyataan yang mendekati ideal } (X_i)}$$

- c. Perhitungan jarak kerapatan

Asumsi semua parameter penting, jarak kerapatan dihitung berdasarkan jumlah parameter = 1/jumlah parameter.

$$L1 = (\lambda, k) = 1 - \sum \lambda d^k_i$$

$$L2 = (\lambda, k) = [\sum \lambda_1^2 (1 - d^k_i)]^{1/2}$$

$$L\infty = \text{maks}[\lambda_1(1 - d^k_i)]$$

- d. Perlakuan terbaik dipilih dari alternatif yang mempunyai nilai $L1$, $L2$, dan $L\infty$ terkecil.

Lampiran 6. Data Perlakuan Terbaik

Tabel Parameter Perlakuan Terbaik

Perlakuan	Kadar asam sitrat	Total Gula Reduksi
A11	19,20	170
A12	17,28	185
A13	19,20	149
A14	21,12	150
A15	17,28	141
A21	19,20	161
A22	21,12	157
A23	19,20	176
A24	21,12	167
A25	24,96	178
A31	19,20	143
A32	19,20	110
A33	23,04	123
A34	23,04	150
A35	23,04	195
A41	21,12	162
A42	23,04	181
A43	24,96	177
A44	24,96	162
A45	24,96	186
A51	26,88	186
A52	26,88	184
A53	26,88	145
A54	23,64	174
A55	28,80	132

Lanjutan **Lampiran 6**

Tabel Pemilihan Perlakuan Terbaik

Perlakuan	Derajat kerapatan		Jarak kerapatan			Perlakuan Terbaik
	Kadar asam sitrat	Total Gula Reduksi	L1	L2	L~	
A11	0,667	0,647	0,343	0,059	0,176	A5
A12	0,600	0,595	0,403	0,081	0,203	
A13	0,667	0,738	0,298	0,045	0,167	
A14	0,733	0,733	0,267	0,036	0,133	
A15	0,600	0,780	0,310	0,052	0,200	
A21	0,667	0,683	0,325	0,053	0,167	
A22	0,733	0,701	0,283	0,040	0,150	
A23	0,667	0,625	0,354	0,063	0,188	
A24	0,733	0,659	0,304	0,047	0,171	
A25	0,867	0,618	0,258	0,041	0,191	
A31	0,667	0,769	0,282	0,041	0,167	
A32	0,667	1,000	0,167	0,028	0,167	
A33	0,800	0,894	0,153	0,013	0,100	
A34	0,800	0,733	0,233	0,028	0,133	
A35	0,800	0,564	0,318	0,058	0,218	
A41	0,733	0,679	0,294	0,044	0,160	
A42	0,800	0,608	0,296	0,048	0,196	
A43	0,867	0,621	0,256	0,040	0,189	
A44	0,867	0,679	0,227	0,030	0,160	
A45	0,867	0,591	0,271	0,046	0,204	
A51	0,933	0,591	0,238	0,043	0,204	
A52	0,933	0,598	0,234	0,042	0,201	
A53	0,933	0,759	0,154	0,016	0,121	
A54	0,821	0,632	0,273	0,042	0,184	
A55	1,000	0,833	0,083	0,007	0,083	

Lampiran 7. Data Serapan Spektrum Inframerah Perlakuan Terbaik (A5)

No	Puncak Serapan (cm ⁻¹)	Intensitas (%)
1	3381,74	37,017
2	2943,29	26,451
3	1757,79	41,491
4	1719,22	47,266
5	1701,86	21,574
6	1636,29	57,440
7	1456,92	16,411
8	1404,84	14,612
9	1364,34	16,729
10	1321,91	22,502
11	1279,48	19,476
12	1225,48	24,064
13	1150,26	36,120
14	1103,97	33,523
15	1078,90	18,912
16	1044,18	38,700
17	774,16	14,378
18	724,02	23,203
19	644,94	23,978
20	567,80	37,428
21	504,15	57,702
22	459,79	10,086

Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian



Media beras



Aspergillus niger
pada media beras
(umur 7 hari)



Bubuk *Aspergillus niger*



Media fermentasi kulit
pisang Raja



Proses fermentasi
oleh *Aspergillus niger*



Ekstraksi substrat
hasil fermentasi



Sampel ekstrak kulit
pisang Raja untuk
titrasi



Proses titrasi untuk
pengukuran kadar
asam sitrat



Proses pengukuran
total gula reduksi

